

#

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular



**LA PATOLOGÍA DE GRANOS ARGIRÓFILOS
Y LA TAUPATÍA DE TIPO ALZHEIMER:
CARACTERÍSTICAS COMUNES Y DIFERENCIALES.**

TESIS DOCTORAL

Alberto Rábano Gutiérrez del Arroyo

Madrid, 2013



CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR "SEVERO OCHOA"

Madrid, 22 de noviembre de 2013

Jesús Avila de Grado, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

INFORMAN

Que la presente tesis doctoral titulada "La patología de granos argirófilos y la taupatía de tipo Alzheimer; características comunes y diferenciales" ha sido realizada bajo nuestra dirección por D. Alberto Rábano Gutiérrez del Arroyo. Consideramos que el trabajo reviste las características de originalidad y calidad científica requeridas para ser defendida como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor.

Los directores de la tesis,

Dr. Jesús Avila de grado

A José Luis Barros,
en la memoria

Josef erschrak ein wenig. Nun also sollte er seine Freiheit verlieren. «Ach», sagte er schüchtern, «ich hoffe, man werde mich an irgendeinem bescheidenem Platz brauchen können. Doch hatte ich, um es Euch zu gestehen, allerdings gehofft, noch eine Weile frei studieren zu können.» Der Magister blickte ihm mit seinem klugen, leicht ironischen Lächeln fest in die Augen. «Eine Weile, sagst du, aber wie lang is das?» Knecht lachte verlegen. «Ich weiß es wirklich nicht.»

Hermann Hesse, *Das Glasperlenspiel*

Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	6
SUMMARY	7
ABREVIATURAS.....	8
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. EL LÓBULO TEMPORAL MEDIAL Y EL SISTEMA LÍMBICO.....	10
1.1.1. REGIONES ANATÓMICAS.....	10
1.1.2. CITOARQUITECTURA Y POBLACIONES NEURONALES.....	13
1.1.3. CONECTIVIDAD INTRÍNSECA Y EXTRÍNSECA.....	15
1.1.4. VULNERABILIDAD NEURONAL SELECTIVA Y PATOLOGÍA	16
1.2. LA TAUPATÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	17
1.2.1. CONTEXTO CLÍNICO-PATOLÓGICO	17
1.2.2. LESIONES HISTOLÓGICAS CARACTERÍSTICAS	18
1.2.3. ESTADIOS NEUROPATOLÓGICOS.....	20
1.2.4. VARIABILIDAD FENOTÍPICA	23
1.2.5. PATOLOGÍA MOLECULAR DE LA PROTEÍNA TAU	24
1.3. LA PATOLOGÍA DE GRANOS ARGIRÓFILOS.....	26
1.3.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS Y CLÍNICOS.....	26
1.3.2. LESIONES CELULARES CARACTERÍSTICAS	27
1.3.3. DISTRIBUCIÓN REGIONAL Y ESTADIOS NEUROPATOLÓGICOS.....	29
1.3.4. PATOLOGÍA MOLECULAR DE LAS TAUPATÍAS 4R.....	31
1.4. PATOLOGÍA COMBINADA EN TAUPATÍAS	32
1.4.1. COMBINACIÓN DE TAUPATÍAS ESPORÁDICAS	32
1.4.2. PATOLOGÍA DE TIPO ALZHEIMER EN TAUPATÍAS ESPORÁDICAS	32
1.5. GENÉTICA DE LAS TAUPATÍAS ESPORÁDICAS.....	33
1.6. TRANSMISIBILIDAD DE PROTEÍNAS: MODELOS PATOGENICOS EN TAUPATÍAS.	34
2. OBJETIVOS	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
3.1. SERIES DE CASOS	39
3.2. PROCEDIMIENTOS NEUROPATOLÓGICOS BÁSICOS	40
3.3. MÉTODOS HISTOLÓGICOS.....	41

3.4.	VARIABLES CLÍNICAS Y NEUROPATOLÓGICAS	42
3.5.	ESTUDIO DE EXPRESION GÉNICA.....	43
3.6.	EXTRACCIÓN DE TAU Y WESTERN-BLOT.....	44
3.7.	AISLAMIENTO DE FIBRAS E INMUNOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA	45
3.8.	ESTUDIOS MORFOLÓGICOS MEDIANTE INYECCIÓN INTRANEURONAL.....	45
3.9.	ESTUDIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS.....	46
3.10.	ASPECTOS ÉTICOS.....	47
4.	RESULTADOS	49
4.1.	DATOS CLÍNICO-EPIDEMIOLOGICOS	49
4.2.	HALLAZGOS NEUROPATOLÓGICOS	51
4.2.1.	PERFIL NEUROPATOLÓGICO DE LA PGA.....	51
4.2.2.	CLASIFICACIÓN NEUROPATOLÓGICA	53
4.2.3.	PATOLOGÍA COMBINADA.....	54
4.2.4.	DISTRIBUCIÓN DE LA PATOLOGÍA Y ESTADIOS	56
4.3.	ANÁLISIS DE ISOFORMAS DE TAU	61
4.4.	AISLAMIENTO DE FIBRAS E INMUNOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA	62
4.5.	ESTUDIOS MORFOLÓGICOS MEDIANTE INYECCIÓN INTRANEURONAL.....	64
4.6.	EXPRESIÓN GÉNICA EN EL CÓRTEX ENTORRINAL.....	66
4.7.	ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS	67
5.	DISCUSIÓN.....	70
5.1.	HALLAZGOS CLÍNICO-EPIDEMIOLOGICOS	70
5.2.	HALLAZGOS NEUROPATOLÓGICOS	72
5.3.	ANÁLISIS MOLECULAR DE LA PROTEÍNA TAU	75
5.4.	ESTUDIO MORFOLÓGICO MEDIANTE INYECCIÓN INTRANEURONAL.....	77
5.5.	EXPRESIÓN GÉNICA EN EL CÓRTEX ENTORRINAL.....	79
5.6.	ASOCIACIÓN A POLIMORFISMOS GENÉTICOS.....	81
5.7.	IMPLICACIONES PARA UN MODELO PATOGENICO BASADO EN LA PROPAGACIÓN DE LA TAUPATÍA	82
6.	CONCLUSIONES	87
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	90
	Soto C. Transmissible proteins: expanding the prion heresy. Cell. 2012 May 25;149(5):968-77	101
8.	MATERIAL SUPLEMENTARIO	106

AGRADECIMIENTOS

A Jesús Ávila y Félix Hernández, por su apoyo, su confianza, y también por su paciencia, durante la elaboración de los trabajos que conforman esta tesis.

A Elena Gómez, Izaskun Rodal, Lourdes Peyres y Vicky Martínez por su excelente trabajo neurohistológico en los bancos de cerebros de Madrid y Murcia.

A Raquel Cuadros, por su infatigable perfeccionismo en las técnicas moleculares de esta tesis.

Al personal del biobanco del H. U. Fundación Alcorcón, por todo lo que compartimos hace años, incluida la serie de casos estudiados allí. A Julia Molina, en especial, por su eficacia y su lealtad.

A Javier de Felipe y su grupo de investigación, por permitirme compartir sus técnicas morfológicas.

A Miguel Calero, Ana Pastor y Olga Calero, por su colaboración en los análisis genéticos.

A Ismael Santamaría, por su colaboración en el análisis de expresión génica.

A M^a Angeles Pérez y Pablo Martínez, mis jefes, por crear un entorno de trabajo en el que es posible elaborar una tesis “tardía”.

A Justo García de Yébenes y Carmen Antúnez por haber dado el impulso fundamental para la creación del primer banco de cerebros de Madrid y Murcia, respectivamente.

A la Fundación Reina Sofía por la financiación de dos proyectos de investigación en los que se basa esta tesis, y en especial, a Arturo Coello, por su apoyo al Banco de Tejidos CIEN.

A los donantes, familiares y clínicos que han puesto su confianza en los distintos bancos de cerebros a lo largo de estos años.

A Pablo, Alejandro y Mali, testigos directos, comprensivos y entusiastas de la gestación de esta tesis.

SUMMARY

Argyrophylic grain disease (AGD) is a sporadic 4R tauopathy that usually presents in combination with other sporadic tauopathies or with Alzheimer's disease (AD) pathology, and may contribute to dementia in older age patients. In previous studies, a detailed analysis of AGD pathology in the medial temporal lobe has been hampered by the common presence of concurrent Alzheimer's changes. With the objective to assess the potentiality of AGD in research on tau pathogenesis and propagation, here we present a study of a series of AGD postmortem cases ($n = 53$), selected from a reference series of 511 brains donated to 3 brain banks in Spain. All cases were thoroughly evaluated according to consensus neuropathological methods and protocols. A detailed neuropathological evaluation of the medial temporal lobe was accomplished at three coronal levels with Gallyas stain, p62, AT8 and AT100 antibodies. A subgroup of cases with Braak-stage \leq II ($n = 23$) was selected for detailed morphological and molecular study. Western blot analysis of the entorhinal and hippocampal cortex was performed in 8 cases with a panel of anti-tau antibodies. Cases were genotyped for *APOE* polymorphism and for H1/H2 alleles of the *MAPT* gene. All cases, and particularly lower-Braak stage cases, displayed a highly homogeneous pattern of involvement by argyrophylic grains and pretangles between connected regions (primarily, basolateral nuclei of the amygdala, entorhinal/transentorhinal cortex, hippocampal cortex). Staging of cases reveals progression of pathology along well-established neuroanatomical pathways, with independence of the progression of Alzheimer's type pathology (either tau or β -amyloid pathology). Western blot studies yielded a specific pattern of isoforms with a characteristic predominant band at 64k. Genetic analysis showed a strong association to the H1 allele of the *MAPT* gene. AGD may thus be an optimal natural disease model for testing hypotheses related to tau propagation in human tissue.

Additionally, the entorhinal cortex of 6 control brains was studied in order to establish the differential features of the upper layers, where the earliest cell lesions of Alzheimer's type and argyrophylic grain pathologies develop. To define the molecular characteristics of these neuron populations, microarrays were used to define the gene expression in that region. In this way, we identified several genes that are expressed distinctly in the upper and lower layers of the entorhinal cortex. These include the genes encoding the matrix Gla protein, collagen type 1_2, reelin, semaphorin 3C or the relaxin receptor, all related to the extracellular matrix. Thus, differences in the extracellular matrix components between the upper and lower layers of the entorhinal cortex may in part explain the vulnerability of neurons present in the upper layers of this brain region in disorders like Alzheimer's disease or argyrophylic grain disease.

In a further study here included 5 brains with Alzheimer's type pathology were studied using intracellular injections of Lucifer yellow in fixed tissue to analyse over 19500 dendritic spines that were completely reconstructed in three dimensions along the length of the basal dendrites of pyramidal neurons in the parahippocampal cortex and CA1. Following intracellular injection, sections were immunostained for anti-Lucifer yellow and with tau monoclonal antibodies AT8 and PHF-1. We observed that the diffuse accumulation of phospho-tau in a putative pre-tangle state did not induce changes in the dendrites of pyramidal neurons, whereas the presence of tau aggregates forming intraneuronal neurofibrillary tangles was associated with progressive alteration of dendritic spines (loss of dendritic spines and changes in their morphology) and dendrite atrophy, depending on the degree of tangle development.

ABREVIATURAS

AB	área de Brodmann	IGG	inclusiones globulares gliales
AMS	atrofia multisistémica	iONF	ovillos neurofibrilares intracelulares
CA	sectores del córtex del hipocampo (1-4)	LCR	líquido cefalorraquídeo
CERAD	<i>Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease</i>	LTM	lóbulo temporal medial
CB	<i>coiled bodies</i>	LY	Lucifer-yellow
CxE	córtex entorrinal	MAP	<i>microtubule-associated protein</i> proteína asociada a microtúbulos
CxP	córtex perirrinal	MGP	<i>matrix Gla protein</i> proteína Gla de la matriz
CxT	córtex transentorrinal	NB	neurona balonizada
DCL	demencia con cuerpos de Lewy	ND	no determinado
DCB	degeneración córticobasal	NIA	<i>National Institute of Aging</i>
DT	desviación típica	NrD	neurita distrófica
DUM	dominio de unión a microtúbulos	NV	no valorable
EA	enfermedad de Alzheimer	ONF	Ovillos neurofibrilares
ECJ	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob	PGA	patología de granos argirófilos
EGA	enfermedad de granos argirófilos	PFH	paraformaldehído
ELA	esclerosis lateral amiotrófica	PHFs	<i>paired heliocidal filaments</i> , filamentos helicoidales apareados
eONF	ovillos neurofibrilares extracelulares	pONF	preovillos neurofibrilares
EETH	encefalopatías espongiiformes transmi- sibles humanas	PN	placas neuríticas
FH	formación del hipocampo	PrP	preoteína priónica
HN	hebras neuropílicas	PSP	parálisis supranuclear progresiva
DCB	degeneración córticobasal	PTA	patología de tipo Alzheimer
DFT	demencia frontotemporal	3R	isoformas de tau de 3 repeticiones (exón 10)
DLFT	degeneración lobar frontotemporal	4R	isoformas de tau de 4 repeticiones (exón 10)
DLFT-tau	DLFT con patología tau (+)	SC	surco colateral
ECJ	enfermedad de Creutzfeldt-Jakob	SEMA 3C	semaforina 3C
FEZF2	<i>FEZ family zinc finger 2</i> péptido 2 de la familia de <i>zinc finger</i>	TDP-43	transactive response DNA binding protein
FH	formación del hipocampo	TAGLN	transgelina
GA	granos argirófilos	RXFP1	relaxin insulin-like family peptide recep- tor 1
GD	giro dentado (<i>fascia dentata</i>)		
H/E	tinción de hematoxilina-eosina		
HC	hipocampo		
HN	hebras neuropílicas		

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL LÓBULO TEMPORAL MEDIAL Y EL SISTEMA LÍMBICO

1.1.1. REGIONES ANATÓMICAS

Se emplea el término “lóbulo temporal medial” (LTM) para designar, en el cerebro humano, un conjunto de estructuras situadas en la porción medial del lóbulo temporal, bilateralmente: la formación del hipocampo (FH), el córtex entorrinal (CxE) y las áreas isocorticales adyacentes (Squire *et al.*, 2004). Esta región anatómica forma parte del sistema límbico (Maclean, 1952), definido a partir del “lóbulo límbico” de Paul Broca (Broca, 1878) y del circuito de Papez (Papez, 1937). El sistema límbico incluye regiones cerebrales corticales y subcorticales, con múltiples funciones relacionadas con la actividad cognitiva (fundamentalmente, el aprendizaje y la memoria) y las emociones (Lavenex, 2012).

En los primates, los principales componentes telencefálicos del sistema límbico se disponen en forma de “C”, similar a la del núcleo caudado, como consecuencia del gran desarrollo del cerebro anterior (Martin, 2012): i) el isocórtex asociativo límbico, ii) la FH y su vía eferente, el fórnix, y iii) parte de la amígdala y uno de sus tractos eferentes, la *stria terminalis*. La FH está constituida por el hipocampo propiamente dicho (asta de Ammon), el giro dentado (GD) y el subículum.

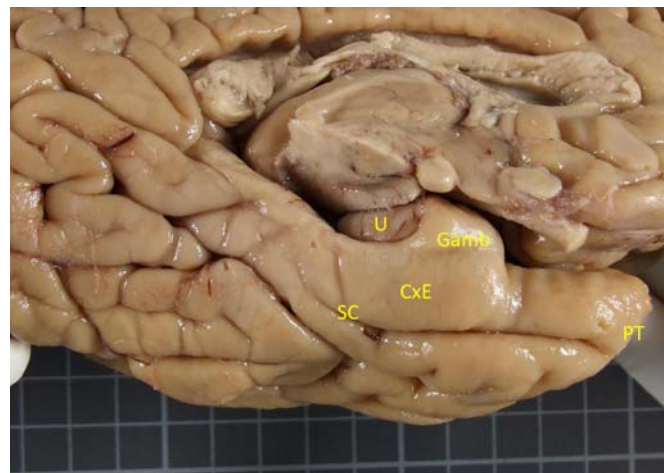


Figura 1. Imagen macroscópica del lóbulo temporal medial. CxE: córtex entorrinal, SC: surco colateral, U: uncus, Gamb: *gyrus ambiens*, PT: polo temporal.

El surco colateral forma la mayor parte del borde lateral del córtex parahipocampal (**Fig. 1**). Este incluye, en su segmento anterior, el CxE, y el córtex perirrinal (CxP) asociado, mientras que el segmento posterior incluye las áreas TF y TH de Von Economo (Amaral and Lavenex, 2007). El límite lateral del CxE se encuentra aproximadamente en el punto medio de la vertiente medial del surco colateral. Los

dos campos del CxP forman el resto de la vertiente medial, el fondo y una porción de la vertiente lateral del surco colateral.

En todas las especies, diversas regiones corticales envían proyecciones convergentes a la formación del hipocampo a través de tres estructuras principales: el CxP, el córtex parahipocampal (en primates), y el CxE (Lavenex, 2012). En el ser humano, el CxP corresponde a las áreas de Brodmann (AB) 35 y 36, que pueden subdividirse mediolateralmente en AB 35a y 35b, 36a y 36b. El córtex parahipocampal se subdivide, a su vez, en las áreas TH, TFm y TFI (Suzuki and Amaral, 2003). El CxE reviste el uncus y la porción anterior del giro parahipocampal (AB 28). En un nivel rostral, el límite medial del CxE (*gyrus ambiens*) lo constituye el córtex periamigdalino. En niveles caudales, el límite medial lo definen el presubículo o el parasubículo. Los límites laterales, en la región caudal los establece el AB 35, de citoarquitectura característica. La zona de superposición (oblicua) de las dos regiones corresponde al “córtex transentorrinal” (CxT) de H. Braak (Braak, 1980).

Entre el CxE y el córtex del hipocampo se disponen el parasubículo, el presubículo y el subículo (complejo subicular). El CxE pertenece a la FH, y es su principal vía de entrada de aferencias. Es la región de la FH más expandida en primates, en comparación con otras especies. En el ser humano se han identificado 8 subdivisiones del CxE sobre una base citoarquitectural: Eo, Er, Elr, Elc, Ei, Emi, Ec y Ecl (Insausti *et al.*, 1995).

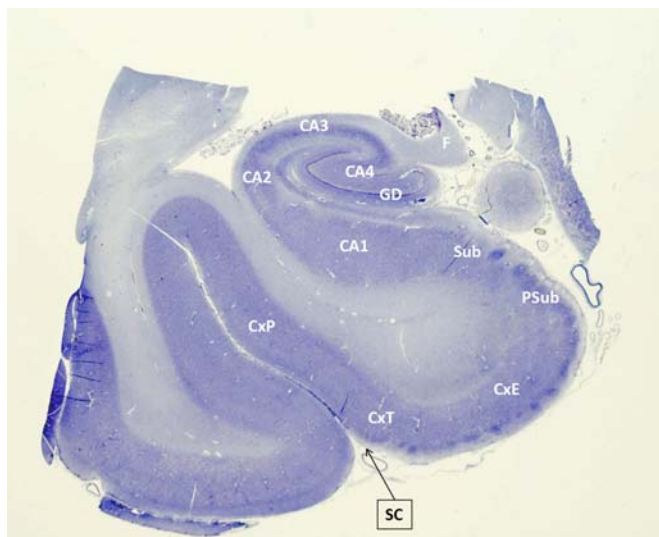


Figura 2. Sección coronal de la formación del hipocampo humana. Tinción de Nissl. SC: surco colateral, CxP: córtex perirrinal, CxT: córtex transentorrinal, CxE: córtex entorrinal, PSub: presubículo, Sub: subículo, CA1: sector CA1 del asta de Ammón, CA2: sector CA2, CA3: sector CA3, CA4: hilio del giro dentado, GD: giro dentado, F: fimbria.

En el ser humano, el hipocampo, se encuentra situado en el suelo del asta temporal del ventrículo lateral, y consta de una porción rostral expandida (*pes hippocampi*) y un cuerpo, cuyo diámetro se

reduce en sentido caudal, y mide 4 - 4,5 cm de dimensión ántero-posterior. El hipocampo está formado por dos bandas corticales imbricadas: el asta de Ammón (CA), en continuidad con el subículum, se encuentra rodeada en su segmento terminal por el GD. Al igual que el isocórtex, el córtex del hipocampo contiene células piramidales (de proyección) y no piramidales (interneuronas), si bien formando una sola capa celular, situada entre dos capas hipocelulares (**Fig. 2**). Las características citoarquitecturales de la capa piramidal son la base de la división del córtex del hipocampo en tres sectores (CA1-3). La porción proximal de CA3 ocupa la región comprendida entre las ramas del GD (hilio, también CA4). Los axones de las neuronas piramidales se reúnen en el alveus, la principal vía eferente del hipocampo, que convergen en la fimbria, y que a su vez se continúa en el fórnix al salir del hipocampo.

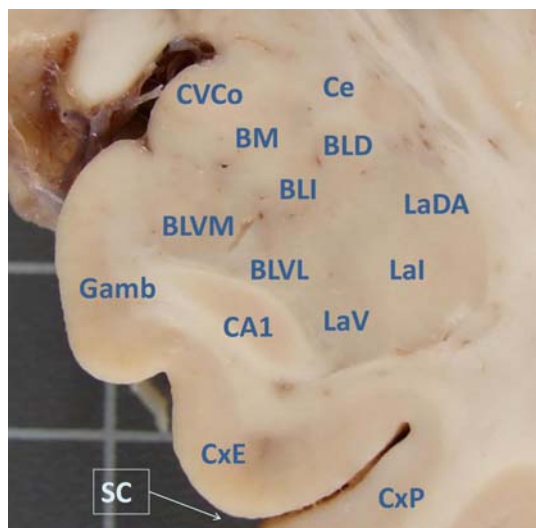


Figura 3. Imagen macroscópica de la amígdala, plano coronal, e identificación de los núcleos según Insausti and Amaral (2004). CxP: córtex perirrinal; CxE: córtex entorrinal; Gamb: *gyrus ambiens*; CA1: sector CA1, córtex del hipocampo; BLVM: n. basolateral ventromedial; BLVL: n. basolateral ventrolateral; LaV: n. lateral ventral; CVCo: n. cortical caudal ventral; BM: n. basomedial; BLI: n. basolateral intermedio; LaI: n. lateral intermedio; BLD: n. basolateral dorsal; LaDA: n. lateral dorsal anterior; Ce: n. central; SC: surco colateral.

La amígdala también forma parte del LTM, en sentido amplio. Está situada en el segmento rostral del lóbulo temporal, por debajo del córtex parahipocampal, y, con el hipocampo, forma el uncus (**Fig. 3**). La amígdala contiene tres divisiones anatómicas: i) la división cortical (corticomedial) está en continuidad con el córtex temporal medial suprayacente, y recibe sus aferencias principales directamente del bulbo olfatorio; ii) la división basolateral es la de mayor tamaño, y recibe sus aferencias directas desde distintas cortezas asociativas límbicas, a las que proyecta también directamente, junto al hipocampo, el n. dorsomedial del tálamo y el n. basalis de Meynert; iii) la división central está conectada con núcleos del sistema autónomo, y recibe su aferencia principal de los nn. basolaterales.

1.1.2. CITOARQUITECTURA Y POBLACIONES NEURONALES

Córtex transentorrinal (CxT)

La zona limítrofe entre el CxE y el CxP ha sido denominada córtex transentorrinal (CxT) por H. Braak (Braak, 1980). En esta zona, la capa II del CxE sigue un trayecto oblicuo por debajo de las capas del CxP, a lo largo del cual las neuronas estrelladas del CxE (Pre- α) van siendo sustituidas por neuronas de conformación piramidal.

Córtex entorrinal (CxE)

Capa I: Acelular o plexiforme, es algo más gruesa en niveles posteriores.

Capa II: Capa celular constituida por islotes de células piramidales grandes modificadas y células estrelladas, que son más numerosas en el CxE medial (Spruston and McBain, 2007). Estos grupos celulares forman pequeñas prominencias en la superficie del CxE (glomérulos de Arnold). Los axones de las células estrelladas descienden a través del fascículo angular y forman la vía perforante principal. Las células estrelladas del CxE lateral proyectan al tercio distal de las dendritas de la células granulares del GD (capa molecular), mientras que las células del CxE medial proyectan al tercio medio. Las células estrelladas también proyectan a CA3. Las células piramidales ocupan el tercio más profundo de la capa, y tienen las mismas proyecciones que las células estrelladas.

Capa III: Amplia capa de células piramidales de tamaño mediano. Existen dos tipos de células piramidales. Las células de tipo 1 (espinosas) proyectan a CA1 y subículum (vía perforante menor o alvear). Entre las capas II y III existe un espacio acelular, más expandido en niveles posteriores. En niveles caudales, las células piramidales adoptan una disposición columnar. Las dendritas de las neuronas piramidales de la capa III se introducen en los intersticios de los islotes celulares de la capa II (Mikkonen *et al.*, 2000).

Capa IV (nomenclatura de Cajal): Una de las principales características del CxE es la ausencia de una capa granular interna. En su lugar se encuentra una capa de fibras acelular, la *lamina dissecans* (más patente en niveles medios rostro-caudales del CxE). En las regiones del CxE donde la *lamina dissecans* no es prominente, las capas III y V se aponen.

Las capas profundas del CxE contienen neuronas piramidales (2/3 del total) y no piramidales (polimórficas o multipolares). Sus axones discurren por el fascículo angular, y proyectan a diversas áreas corticales, incluyendo muchas de las áreas que proyectan a las capas superficiales del CxE. También existen proyecciones al GD y al córtex del hipocampo, como parte de la vía perforante.

Capa V: Tiene una profundidad de 5-6 células, y está compuesta por células piramidales grandes. Se encuentra más desarrollada en niveles medios y caudales del CxE, donde pueden distinguirse tres subcapas: la capa más superficial (Va) contiene las células piramidales más grandes del CxE, mientras que la subcapa intermedia (Vb) contiene células de menor tamaño y disposición menos regular. La subcapa más profunda (Vc) contiene un número menor de neuronas, así como un denso plexo de fibras. En sectores caudales del CxE la subcapa Vc está más marcada.

Capa VI: No es fácil distinguirla de la capa V en niveles rostrales, y tampoco muestra un límite neto con la sustancia blanca. Sin embargo, en niveles caudales la capa VI muestra una transición neta con la sustancia blanca. En el límite medial con el córtex perirrinal, la capa VI termina más medialmente que la capa V, lo que produce un límite global oblicuo entre las dos áreas (Insausti and Amaral, 2004).

Subiculum

En su segmento más próximo al presubículo, el subículo presenta una organización laminar en tres capas. En la capa molecular, más superficial, se distribuyen las dendritas apicales de las células piramidales y proyecciones del córtex entorrinal. En algunos niveles, islotes de la capa II del presubículo invaden la capa molecular del subículo. La capa piramidal del subículo, donde terminan la mayoría de las proyecciones de CA1, se puede subdividir en dos subláminas. Las células piramidales del subículo tienden a ser algo mayores y a estar más espaciadas que las de CA1. Las células de la capa piramidal externa (más próxima a la capa molecular) son más grandes que las de la capa interna, y muchas de ellas contienen abundante lipofusina en la porción proximal de sus dendritas apicales. El límite superficial de la capa piramidal externa contiene islotes de células pequeñas. La porción profunda de la capa piramidal interna contiene células más pequeñas (capa polimórfica). El límite del subículo con CA1 es oblicuo, de modo que la capa de células piramidales de CA1 se extiende sobre la porción proximal del subículo.

Córtex del hipocampo

Desde la superficie hasta su nivel más profundo, el córtex del hipocampo puede dividirse en 6 capas, que corresponden a las 3 capas características del allocórtex: *stratum lacunosum-moleculare*, *stratum radiatum*, *stratum lucidum* (capa molecular del allocórtex), *stratum pyramidale* (capa celular del allocórtex), *stratum oriens* y el alveus (capa polimórfica del allocórtex). Las neuronas predominantes en el córtex del hipocampo son células piramidales dobles, así denominadas porque sus arborizaciones dendríticas se extienden en dos direcciones polares.

Sector CA1. Puede distinguirse del subículum por la presencia de un *stratum radiatum*, y por la reducción en el espesor de la capa piramidal. Es el sector más extenso del hipocampo humano. En general, las neuronas de CA1 son más pequeñas que las del subículum o las de CA2-3.

Sector CA2. Es el sector más estrecho del hipocampo, y sus neuronas piramidales son más grandes y están más densamente agrupadas que las de CA1. CA2 se distingue de CA3 por la ausencia de terminales de las fibras musgosas (originadas en el GD), por lo que carece de *stratum lucidum*.

Sector CA3. Contiene neuronas piramidales grandes, ligeramente más espaciadas que las de CA2, y un *stratum lucidum*. A medida que CA3 se aproxima al GD, las células piramidales aparecen menos agrupadas y menos organizadas en filas paralelas. Con frecuencia, el segmento de CA3 incluido en el hilio del GD se denomina, de forma diferenciada, CA4.

Giro dentado

El GD está compuesto por tres capas: la capa molecular, la capa de células granulares, y la capa polimórfica. La capa molecular es hipocelular, y contiene las dendritas de las células granulares, un pequeño número de interneuronas, fibras de la vía perforante originadas en el córtex entorrinal, distintos tipos de fibras intrínsecas al GD, y fibras originadas en distintas áreas subcorticales. La capa de células granulares está formada por células granulares densamente agrupadas. El GD es, junto al bulbo olfatorio, una de las regiones cerebrales donde se ha demostrado inequívocamente la presencia de neurogénesis postnatal. En el límite entre las capas de células granulares y polimórfica se encuentran las células piramidales en cesto. La capa polimórfica contiene diversos tipos celulares, siendo el más destacado el de las células musgosas, cuyas dendritas proximales están cubiertas por complejas espinas denominadas excrecencias espinosas, donde terminan los axones de las células granulares del GD.

El contenido de las distintas capas corticales en cada sector del hipocampo se encuentra resumido en el **Material Suplementario, Fig. 1**.

1.1.3. CONECTIVIDAD INTRÍNSECA Y EXTRÍNSECA

La principal vía de entrada de señales al hipocampo es el córtex entorrinal, que a su vez recibe señales de la porción ventral del lóbulo temporal, el córtex orbitofrontal, áreas corticales adyacentes al córtex entorrinal, cortezas sensitivas primarias, el córtex cingular, los núcleos del septo y numerosas estructuras subcorticales. La mayoría de las conexiones del córtex entorrinal son recíprocas (Insausti and Amaral, 2004; Amaral and Lavenex, 2007; Lavenex, 2012).

El córtex entorrinal constituye la principal fuente de fibras aferentes del hipocampo. La vía perforante, originada en áreas laterales y distales del córtex entorrinal, atraviesa el subículum y termina en las dendritas de las células granulares (capa molecular del giro dentado). Una vía perforante menor (alvear) proyecta desde el córtex entorrinal hasta el subículum y las capas superiores de CA1 y CA3. Las células granulares del giro dentado proyectan hacia CA3 a través de las fibras musgosas. Las neuronas piramidales de CA3, a su vez, proyectan hacia CA1 a través de ramas colaterales que emiten sus axones antes de entrar en el alveus (colaterales de Schaffer). Se ha interpretado el eje de conexiones internas principal del hipocampo como un bucle trisináptico. Este bucle enviaría señales desde el córtex entorrinal al giro dentado, desde éste a CA3, de CA3 a CA1, de CA1 al subículum y de éste de nuevo al córtex entorrinal.

Además de este núcleo de conexiones internas, existen también proyecciones directas desde el giro dentado a CA1, conexiones directas y recíprocas entre el córtex entorrinal y CA1, y conexiones directas y recíprocas entre CA1 y la amígdala. El subículum y el córtex entorrinal, al igual que la amígdala, mantienen conexiones recíprocas con extensas áreas de isocórtex asociativo.

Se considera que el bucle trisináptico es esencial para el mantenimiento de la memoria a corto plazo, mientras que las conexiones corticales recíprocas del córtex entorrinal y subículum permiten el almacenamiento a largo plazo de la memoria. El córtex subicular también proyecta al núcleo accumbens y al tubérculo olfatorio, lo que implica una estrecha conexión entre los sistemas límbico y estriatal. Otro circuito ya mencionado en el que interviene el hipocampo es el llamado circuito de Papez. Las proyecciones desde el cuerpo mamilar llegan a los núcleos anteriores del tálamo, y desde estos al córtex cingular, que a su vez proyecta al córtex entorrinal. De nuevo, el área de proyección principal del hipocampo, a través del fórnix, son los cuerpos mamilares.

El hipocampo también recibe conexiones aferentes a través del fórnix, desde los núcleos del septo, el diencefalo y el tronco cerebral, el núcleo dorsomedial del tálamo y los núcleos paraventriculares. También llegan al hipocampo proyecciones monoaminérgicas del locus coeruleus y serotoninérgicas del rafe mesencefálico. Así mismo, existen proyecciones dopaminérgicas del área tegmental ventral y de la sustancia nigra al córtex cingular, córtex entorrinal e hipocampo (sistema dopaminérgico mesotelencefálico).

1.1.4. VULNERABILIDAD NEURONAL SELECTIVA Y PATOLOGÍA

El hecho de que, en diferentes enfermedades neurológicas, determinadas poblaciones neuronales muestren cambios patológicos, mientras que poblaciones próximas o funcionalmente análogas se

encuentran aparentemente conservadas, ha llamado la atención de los neuropatólogos desde los primeros estudios sistemáticos. Meyer (1936) describió este hallazgo bajo la noción de la “vulnerabilidad selectiva” de determinadas poblaciones neuronales. Distintos grupos de patologías han contribuido a consolidar este concepto en el lóbulo temporal medial (Michaelis, 2012; Small *et al.*, 2011):

- Cuando se produce isquemia/hipoxia del hipocampo (bien por causas focales o por causas globales, como una parada cardíaca), las neuronas piramidales de CA1 y las hiliares de CA4 son las más sensibles al daño neuronal post-isquemia.
- La esclerosis del hipocampo asociada a epilepsia se caracteriza por la pérdida neuronal en sectores específicos del hipocampo, como CA1 y CA4, y por dispersión y muerte neuronal en el GD. Estos cambios se producen como consecuencia de la actividad eléctrica anómala, y a su vez pueden dar lugar a nueva actividad epiléptica.
- Una característica general del envejecimiento cerebral es la pérdida de volumen del hipocampo, especialmente de CA1 y subículum, que se asocia a pérdida neuronal efectiva a ese nivel.
- En la enfermedad de Alzheimer, las lesiones características, especialmente la patología neurofibrilar en sus estadios iniciales, afectan a determinadas poblaciones neuronales del córtex entorrinal, el hipocampo y la amígdala.
- En otras enfermedades neurodegenerativas, taupatías, demencia con cuerpos de Lewy, demencias frontotemporales, enfermedad de Huntington, enfermedades priónicas, entre otras, se han descrito patrones lesionales específicos en el LTM.

1.2.LA TAUPATÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1.2.1. CONTEXTO CLÍNICO-PATOLÓGICO

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia más frecuente, y representa del 50 al 56% de los casos de demencia en series clínicas y neuropatológicas. En combinación con patología vascular cerebral representa un 13-17% adicional (Querfurth and LaFerla, 2010). Se presenta de forma esporádica en el 95% de los casos, y el principal factor de riesgo es la edad. A partir de los 65 años de edad, la incidencia de EA se dobla cada 5 años, y una de cada 3 personas la padecen por encima de los 85 años.

El sustrato neuropatológico de la EA puede describirse mediante datos (lesiones) positivos y negativos (Serrano-Pozo *et al.*, 2011). Datos positivos: placas de amiloide, ovillos neurofibrilares (ONF), hebras neuropílicas (HN) y neuritas distróficas (NrD) (agregados de tau hiperfosforilada), angiopatía amiloide,

cuerpos de Hirano y degeneración granulovacuolar. Las placas neuríticas (PN) y los ONF, especialmente en determinadas poblaciones neuronales, son lesiones específicas de EA. Datos negativos: pérdida de neuronas, neuropilo, y elementos sinápticos. Un tercer grupo de cambios corresponde a procesos reactivos (inflamación y plasticidad) (Duyckaerts *et al.* 2009).

Recientemente, diversos estudios clínico-patológicos longitudinales han puesto de manifiesto la existencia de lesiones características de EA en una proporción relevante de sujetos asintomáticos (Wharton *et al.*, 2011; Schneider JA *et al.*, 2009; O'Brien *et al.*, 2009; SantaCruz *et al.*, 2011), especialmente en los grupos de población de edad avanzada (Sonnen *et al.*, 2011). Dichas lesiones se presentan de acuerdo con un patrón progresivo que sugiere la existencia de fases neuropatológicas sucesivas de la EA, previas a la manifestación clínica de la enfermedad (Jicha *et al.*, 2012). Así mismo, se han definido distintos biomarcadores que permiten detectar la patología preclínica de EA (LCR, neuroimagen). En este contexto, el *International Working Group for New Research Criteria for the Diagnosis of Alzheimer's Disease* ha propuesto designar mediante el término "enfermedad de Alzheimer" la totalidad de la expresión clínico-biológica de la enfermedad *in vivo*, incluyendo sus fases preclínicas, y referirse a los casos confirmados mediante estudio histológico (ante o post mortem) como "EA comprobada neuropatológicamente" (Dubois *et al.*, 2010). Por su parte, en sus últimas directrices para el diagnóstico neuropatológico de la EA, el *National Institute of Aging-Alzheimer's Association* adopta un criterio similar, y recomienda adoptar el término "cambio neuropatológico de EA" para referirse a los hallazgos histopatológicos característicos de la enfermedad, independientemente del estado cognitivo del sujeto (Montine *et al.*, 2012; Hyman *et al.*, 2012).

1.2.2. LESIONES HISTOLÓGICAS CARACTERÍSTICAS

Se incluyen a continuación únicamente las lesiones patológicas de la EA que tienen como base molecular la proteína tau, y que en conjunto conforman la taupatía característica de la EA.

Ovillos neurofibrilares (ONF)

Fueron descritos por primera vez por Alois Alzheimer (Graeber *et al.*, 1998) mediante tinción de Bielschowsky como inclusiones filamentosas intraneuronales que ocupan el perikarion de las neuronas piramidales. Los ONF se observan especialmente en las neuronas piramidales del córtex del hipocampo, del CxE, y de las capas III y V del isocórtex. Entre las primeras neuronas afectadas están las de la capa piramidal fusionada (III + V) que atraviesa la corteza transentorrinal, y las neuronas piramidales de la capa II del córtex entorrinal. También aparecen en el bulbo olfatorio en fases precoces (Kovacs *et al.*, 2001).

Los ONF son argirófilos y se tiñen con métodos de impregnación argéntica, como la tinción de Gallyas, con tioflavina-S, o mediante inmunotinción para tau. Se han descrito tres estadios morfológicos: 1) Pre-ovillos (pONF) u ONF difusos, con inmunotinción difusa de tau, en ocasiones microgranular, en neuronas que muestran una morfología preservada y un núcleo centrado (Bancher *et al.* 1989) ; 2) ONF intraneuronales fibrilares o maduros (iONF), formados por agregados filamentosos citoplásmicos que desplazan el núcleo a la periferia del soma y que con frecuencia se extienden a las dendritas y al segmento proximal del axón; y 3) ONF extraneuronales o “fantasmas” (eONF), que resultan de la muerte de la neurona original, en ausencia de núcleo y citoplasma (Cras *et al.*, 1995). Los eONF carecen de la secuencia C-terminal de tau (Endoh *et al.* 1993), y pueden asociarse a grupos de neuritas que forman una agrupación asociada a un ovillo (*tangle associated neuritic cluster*, TANC), y que puede simular una placa neurítica (Munoz and Wang, 1992).

Tanto las tinciones de tioflavina y plata, como las inmunotinciones con anticuerpos anti-tau como AT8 y PHF-1, muestran preferentemente los iONF y eONF. AT8 reconoce epitopos fosforilados en Ser202 y Thr205, o en Ser199 y 202 o en Ser202 y 208 (Porzig *et al.*, 2007). Sin embargo, otros fosfoepitopos (pThr153, pSer262, pThr231) y un epitopo conformacional reconocido por los anticuerpos MC1 y Alz50 también reconocen los pONF, lo que sugiere que los pONF representan una forma previa a los ONF. El epitopo reconocido por Alz50 es conformacional, y requiere dos epitopos discontinuos, uno de ellos situado en el extremo N-terminal de la molécula, y el otro en la región de unión a microtúbulos (Carmel *et al.*, 1996). AT8 ha mostrado especialmente buena reproducibilidad entre laboratorios en inmunohistoquímica (Braak *et al.*, 2006; Alafuzoff *et al.*, 2008). Muchos, aunque no todos, los ONF presentan inmunorreactividad para ubiquitina y p62. La ubiquitinación es probablemente un fenómeno tardío en los ONF, y todos los ONF reactivos con ubiquitina se tiñen también con rojo tiazina, que detecta la estructura fibrilar (Uchihara *et al.*, 2001). Los ONF también muestran inmunorreactividad para protrombina y trombina, heparan-sulfato, Fe65, flotillina (un marcador de los *rafts*) (revisado en Duyckaerts *et al.* 2009), así como para diversas kinasas, entre ellas CDK5 y GSK3 β .

Los estudios ultraestructurales han mostrado que los ONF están compuestos por filamentos helicoidales apareados (*paired helical filaments*, PHFs), fibrillas de aproximadamente 10 nm de diámetro que se disponen en pares con una conformación tridimensional helicoidal y una periodicidad regular de aproximadamente 65 nm. Los filamentos están compuestos por tau en configuración β cruzada (Berriman *et al.*, 2003). Una proporción de las fibrillas forman filamentos rectos, sin la periodicidad característica de los PHFs (Crowther, 1991). Ocasionalmente, se han descrito filamentos híbridos, que incluyen una transición brusca entre PHFs y filamentos rectos (Crowther, 1991). El principal componente de los PHFs es la proteína asociada a microtúbulos (*microtubule-associated protein*, MAP) tau,

con plegamiento e hiperfosforilación anómalos. Se ha descrito un aumento de los sitios de fosforilación, algunos de ellos posiblemente específicos o sugestivos de fosforilación anómala (Thr231, Ser262) (Wang *et al.*, 2007), así como la aparición de formas N-truncadas durante el proceso de formación de los ONF (Horowitz *et al.*, 2004).

Hebras neuropílicas

Las HN (Braak *et al.* 1986) aparecen siempre asociadas a ONF, y se interpretan como segmentos de dendritas y axones de las neuronas que contienen ONF. Contribuyen considerablemente a la carga total de patología neurofibrilar. Las HN contienen PHFs, que se acumulan en dendritas de neuronas con ONF (Braak and Braak, 1988). Su densidad se correlaciona con la de los ONF, y pueden disminuir en estadios avanzados (Giannakopoulos *et al.* 2007).

Neuritas distróficas

Forman la corona neurítica de las placas neuríticas, y se tiñen con tinciones argénticas. Ultraestructuralmente, corresponden a procesos neuronales distendidos que contienen abundante lipofuchina y cuerpos densos, mitocondrias con cambios degenerativos y PHF (Duyckaerts *et al.*, 2009). Los estudios de inmunotinción y ultraestructurales sugieren que la mayor parte de las NrD son de origen axonal: se tiñen con neurofilamentos pero no con MAP2, y contienen vesículas sinápticas. En las placas neuríticas de la capa molecular del GD, las NrD proceden de la capa II del córtex entorrinal (Hyman *et al.*, 1984). Sólo un subconjunto de neuritas es positivo para AT8 (NrD de tipo 1) (Wang and Munoz, 1995). Otros procesos, morfológicamente similares y menos numerosos, son APP (+) y cromogranina (+) (NrD de tipo 2) (Thal *et al.*, 1998). Sólo una minoría de neuritas son tau (+) y cromogranina (+). Las NrD también pueden contener ubiquitina y neurofilamentos.

1.2.3. ESTADIOS NEUROPATOLÓGICOS

La propuesta original de estadiaje de la degeneración neurofibrilar (Braak and Braak, 1991) se basó en la distribución de los ONF y las HN, en cortes hemisféricos incluidos en polietilenglicol (100 µ) y en cortes contralaterales de parafina (12 µ), teñidos con técnicas argénticas (entre ellas, Bielschowsky y Gallyas) e inmunohistoquímica (beta-amiloide y PHF).

Los estadios I-II (transentorrinales) se definen por la presencia de ONF y HN que se extienden progresivamente desde el CxT al CxE y al córtex del hipocampo (CA1). En los estadios III y IV (límbicos) las inclusiones alcanzan el subículo, la amígdala, el tálamo y el claustró. Por último, en los estadios V-VI (isocorticales), las inclusiones aparecen en áreas isocorticales, extendiéndose desde las áreas corticales

asociativas hacia el córtex motor primario y las áreas sensitivas primarias corticales. (Para una descripción detallada, ver **Material Suplementario, Fig. 2**).

El sistema de estadiaje de Braak se incorporó pronto al diagnóstico neuropatológico de la EA, en combinación con el sistema de evaluación de las PN desarrollado por el CERAD (Mirra *et al.*, 1991), lo que dio lugar a los criterios NIA-Reagan (Hyman and Trojanowski, 1997, Newell *et al.*, 1999).

La incorporación de inmunotinción para anticuerpos anti-tau (AT8) permitió incluir la descripción de pONF en las lesiones iniciales del córtex transentorrinal (Braak and Braak, 1995), y adaptar el sistema de estadiaje original al trabajo de rutina de los laboratorios de neuropatología mediante inmunohistoquímica en cortes de parafina (Braak *et al.*, 2006). La comparación entre la tinción de Gallyas y AT8 demuestra que ambas técnicas ponen de manifiesto los iONF y las HN, y que AT8 muestra además un plexo de prolongaciones (dendritas, axones), que contienen material “pretangle” no argirófilo. A continuación se incluye una descripción detallada de los estadios mediante inmunotinción para tau:

Estadio I: En ausencia de afectación cortical, las primeras lesiones aparecen ocasionalmente (Braak and Del Tredici, 2011) en núcleos subcorticales (*I. coeruleus*, nn. magnocelulares del prosencéfalo basal). La primera afectación cortical se observa en CxT, sin (o con mínima) afectación del CxE, como pONF en neuronas pre- α .

Estadio II: Las lesiones se extienden al CxE y especialmente a las neuronas pre- α (capa II). Se observa, asimismo, inmunorreactividad en la capa pri- α (capa Va) y en células piramidales de CA1, que muestran dendritas apicales varicosas tau (+) que atraviesan el *stratum lacunosum-moleculare*. Existen placas neuríticas aisladas en CA1. Se aprecian finas tramas de fibras reactivas en el *stratum radiatum* y *stratum oriens*.

Estadio III: Las lesiones se extienden al neocórtex de las circunvoluciones fusiforme y lingual (todas las capas). Hay una mayor intensidad de afectación en áreas con lesiones en estadios previos. Se observan frecuentes preovillos en CA1 y CA2, así como densidad moderada de fibras musgosas tau (+) en CA3 y CA4. El GD es negativo.

Estadio IV: Extensión a áreas neocorticales asociativas y aumento de intensidad lesional en áreas previamente afectadas. En CxE, la afectación es máxima en capas profundas (capas Va-c o pri- α , pri- β y pri- γ) y sustancia blanca subyacente. Se observa un gran número de fibras musgosas tau (+) en CA3 y CA4, y algunas neuronas tau (+) en el GD. En neocórtex, existe extensa afectación de la circunvolución temporal media, pero no de la superior.

Estadio V: La patología neocortical se extiende en abanico en dirección frontal, súperolateral y occipital, y alcanza la región periestriatal. Los ONF predominan en las capas isocorticales III y V. Se observa

un plexo neurítico externo en las capas II-IIIab, sin afectación de capas IIIc y IV. El plexo profundo es estrecho y está limitado a la capa V. En córtex visual primario sólo se observan PN y neuronas tau (+) aisladas en la capa IIIab.

Estadio VI: La patología alcanza las áreas neocorticales secundarias y primarias, y en el lóbulo occipital, llega al córtex estriado. La mayoría de las áreas neocorticales presentan afectación intensa y casi todas las capas muestran una tupida red de neuritas tau (+), que se extiende a la capa VI. Se observan axones tau (+) en la sustancia blanca subyacente. En el córtex estriado, se aprecia una densa red de fibras tau (+) en las capas II, IIIab y V.

Posteriormente, se ha propuesto un sistema análogo de estadiaje basado en la patología tau (+) en el LTM (Lace *et al.*, 2009). A continuación se describen las lesiones distintivas que aparecen en cada estadio:

- Estadio 0: Ausencia o mínima presencia de ONF y HN.
- Estadio 1: Frecuencia moderada/severa en CxT, CxE lateral, capa pre- α (capa II) del CxE, límite Ca1/subículum y capa molecular externa del GD.
- Estadio 2: Frecuencia moderada/intensa de HN en CxE medial y capa pri- α del CxE.
- Estadio 3: Frecuencia moderada/intensa en CA1 y CA2.
- Estadio 4: Capa molecular interna del GD, y resto de subiculum.
- Estadio 5: Frecuencia moderada/severa de ONF y HN en CA3 y CA4.

La patología amiloide muestra una débil correlación con el deterioro cognitivo, y es más patente en las primeras fases de la enfermedad, antes de que el cuadro patológico esté dominado por la extensa patología neurofibrilar (Hyman, 2011). Sin embargo, existe una fuerte correlación clínico-patológica con la taupatía a todo lo largo de la evolución de la EA (revisado en Nelson *et al.*, 2009; Nelson *et al.*, 2012). Durante las primeras fases de la enfermedad, los síntomas están relacionados con la pérdida de memoria, en correlación con la presencia de ONFs en allocórtex, sustrato de la memoria episódica. En las fases intermedia y avanzada de la enfermedad se afectan otros dominios cognitivos, como la función ejecutiva, el juicio, las capacidades visuoespaciales y el lenguaje, en paralelo con el desarrollo de ONFs en áreas neocorticales de las que dependen estas funciones. Desde el punto de vista de la correlación clínico-patológica, es relevante la afectación temprana del sistema reticular de activación ascendente, incluyendo n. basalis de Meynert (inervación colinérgica de la corteza), n. tuberomamilar, l. coeruleus, área tegmental ventral, y rafe pontino, con sus neurotransmisores respectivos).

Aunque el estadiaje de Braak y Braak ha suscitado algunas críticas en cuanto a su consistencia (Gertz et. al., 1998; McKee et al., 2006), ha sido ampliamente validado por grupos de expertos (Alazuffo et al., 2008), si bien la concordancia entre evaluadores es menor en estadios intermedios (valoración de ONT en áreas isocorticales, en ausencia de malla de HN).

1.2.4. VARIABILIDAD FENOTÍPICA

La definición de un curso clínico típico y de un patrón característico de progresión neuropatológica ha puesto de manifiesto la existencia de formas atípicas de Alzheimer:

- Formas focales, con presentación en forma de síndromes clínicos característicos por lo general de otras entidades patológicas, p. ej., afasia progresiva, DFT variante conductual, síndrome córtico-basal, o atrofia cortical posterior (Alladi et. al., 2007).
- Existencia de un rango de variabilidad entre formas con preservación relativa del hipocampo (en comparación con isocórtex) (*hippocampal sparing*) y formas con mayor afectación relativa del hipocampo (*limbic-predominant*), entre las cuales se situarían los casos típicos de EA (Murray et al. 2011). Las formas con predominio de afectación límbica parecen corresponder, al menos en parte, a las previamente descritas como *neurofibrillary tangle dementia*, y *tangle-predominant dementia* (Jellinger et al., 2007).
- Formas con asimetría bilateral de la patología, que da lugar a variantes afásicas de EA, con predominio de afectación del hemisferio cerebral izquierdo (Gefen et al., 2012).
- Patología de tipo Alzheimer en la población muy anciana (*oldest-old*). Afectación preferente del segmento anterior del sector CA1 del hipocampo, con relativa preservación del córtex asociativo temporal inferior y frontal (Giannakopoulos et al., 1996), lo que contrasta con la distribución de la patología neurofibrilar (tau+) en pacientes menos ancianos, más acorde con los estadios de Braak (Braak et al., 2006).
- Formas rápidamente progresivas, que con frecuencia plantean el diagnóstico diferencial con enfermedades priónicas (Reinwald et al., 2004; Schmidt et al., 2011; Schmidt et al., 2012).

En todos los contextos anteriores las lesiones histológicas han sido las características de la EA.

1.2.5. PATOLOGÍA MOLECULAR DE LA PROTEÍNA TAU

La proteína tau (τ) se identificó como una proteína asociada a microtúbulos (MAP) a mediados de los años 70 (Weingarten *et al.*, 1975). Está codificada por el gen *MAPT*, situado en el cromosoma 17q21. Los filamentos de tau insoluble e hiperfosforilada constituyen el principal componente de los ONF. Así, tau constituye un marcador molecular central de las taupatías, esto es, las enfermedades neurodegenerativas que presentan inclusiones constituidas por tau: DLFT-tau, incluida la enfermedad de Pick, PSP y DCB, EGA, algunas enfermedades priónicas, el complejo ELA / parkinsonismo-demencia, la encefalopatía traumática crónica, y algunas formas genéticas de E. de Parkinson (Morris *et al.*, 2011; Mandelkovic and Mandelkovic, 2012).

La proteína tau se expresa en el sistema nervioso central y periférico, y en menor cantidad, en tejido renal, pulmonar y testicular. Es más abundante en los axones, pero también se puede encontrar en los compartimentos somatodendríticos (donde predomina MAP2), y en los oligodendrocitos. La entrada de tau en el compartimento somatodendrítico (desencadenado por proteína A β , glutamato, stress oxidativo, etc.) produce una reducción de espinas dendríticas mediada por entrada de Ca²⁺ a través de receptores NMDA. La estructura primaria de la proteína se puede dividir en 4 regiones: 1) una región de proyección N-terminal (dominio de proyección); 2) un dominio rico en prolina, que incluye múltiples sitios de fosforilación; 3) un dominio de unión a microtúbulos (DUM); y 4) una región C-terminal.

El *splicing* alternativo en la región N-terminal da lugar a 6 isoformas de tau características del SNC humano adulto. Tres de ellas incluyen 3 repeticiones del exón 10 (isoformas 3R), y otras 3 incluyen 4 repeticiones del exón 10 (isoformas 4R). Cada una de las series de isoformas 3R y 4R se diferencia por la inclusión de exones adicionales en la región N-terminal (0N= ningún exón, 1N= exón 2, 2N= exón 2 + exón 3). Las mutaciones en *MAPT* se numeran por su localización en la isoforma tau 4R2N. La expresión relativa de distintas isoformas puede tener una variabilidad regional (Trabzuni *et al.*, 2012).

Las taupatías, tanto las esporádicas como las de origen genético (excluyendo enfermedades hereditarias como la E. de Niemann-Pick de tipo C y la distrofia miotónica I y II), pueden clasificarse de acuerdo con el tipo de isoformas de tau predominante: 1) agregados de tipo I (tau 3R y 4R, con triplete de tau en Western blot, 60, 64 y 69 K), a la que corresponde la EA, el parkinsonismo postencefalítico, la demencia postraumática, el s. de Down, y la DLFT-tau; 2) agregados de tipo II (tau 4R, con doblete de tau, con bandas de 64 y 69 K), presentes en DCB, PSP, EGA y algunos casos de DLFT-tau, y 3) agregados de tipo III (tau 3R, doblete de tau, con bandas de 60 y 64 k), que incluye la E. de Pick y algunos casos de DLFT-tau (Buee *et al.*, 2000; Sergeant *et al.*, 2005; Avila *et al.*, 2004).

Diversas kinasas participan en la fosforilación de múltiples residuos de serina y treonina de tau (actualizadas en <http://cnr.iop.kcl.ac.uk/hangerlab/tautable>). La proteína tau patológica sufre además otras modificaciones post-traducción: fosforilación de tirosina, acetilación, *crosslinking* por transglutaminasa, glicación, isomerización, nitración, sumoilación, O-GlcNacetilación y ubiquitinación.

Tau se une a la parte exterior (y posiblemente también a la interior) de los microtúbulos, mientras que sus regiones N y C terminal se proyectan hacia el exterior. La región N-terminal puede asociarse a la membrana celular. Las isoformas con más repeticiones (p.ej., 2N4R) tienden a unirse más intensamente a los microtúbulos que las que contienen menos repeticiones (p.ej., 0N3R). Debido a su carácter hidrofílico, la proteína tau no adopta la estructura de plegamiento compacto típica de la mayoría de las proteínas citosólicas. La cadena polipeptídica es altamente flexible y móvil, con un bajo contenido en estructuras secundarias, que son transitorias.

La fosforilación de tau regula su unión a microtúbulos y se asocia a su agregación patológica. La fosforilación en el DUM y en regiones adyacentes puede alterar su conformación y producir el desprendimiento de tau de los microtúbulos. La DUM contiene también PHF6 y PHF6*, que son secuencias que asumen conformación beta, necesaria para la agregación de tau. En el cerebro adulto existen aproximadamente 2 fosfatos por molécula de tau, mientras que en tejido de Alzheimer esta proporción se eleva a 8 fosfatos o más. También se produce hiperfosforilación de tau en cerebro fetal y en la hibernación de algunos mamíferos.

Tau comparte con MAP1B la función de estabilización de los microtúbulos. Otras funciones de tau son:

- Modulación de las vías de señalización, a través de *scaffolding*.
- Neurogénesis en el adulto. Las células granulares generadas en el giro dentado adulto son ricas en isoformas 3R altamente fosforiladas.

Parece poco probable que el papel patogénico de tau derive de una pérdida de función. Existe evidencia de que la toxicidad de tau deriva de los oligómeros de tau, y de la escasa toxicidad de las inclusiones. Se ha propuesto, asimismo, un posible papel tóxico de los fragmentos de tau derivados de la escisión por caspasa-3, calpaina y catepsina L.

En la agregación de tau en PHF es importante el factor de la carga eléctrica en los residuos centrales de tau, y también la presencia de segmentos beta-plegados (hexapéptidos al comienzo de R2 y R3). Algunas mutaciones, como P301L, favorecen dicha estructura secundaria. Los PHF contienen núcleo de estructura beta.

El modelo patogénico más aceptado actualmente implica que la participación de tau es necesaria para que se produzca la toxicidad por A β en Alzheimer (resumido en Morris *et al.*, 2011; Roberson *et al.* 2007).

1.3.LA PATOLOGÍA DE GRANOS ARGIRÓFILOS

1.3.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS Y CLÍNICOS

La EGA fue descrita en 1987 por H. Braak y E. Braak (Braak and Braak, 1987), y desde entonces varias cuestiones sobre su epidemiología y presentación clínica han resultado controvertidas. Conviene no olvidar, al revisar estas controversias, que la EGA es una entidad neuropatológica, y que no es posible en el momento actual hacer un diagnóstico clínico, ni siquiera de sospecha. Así, pues, todos los datos a que se refieren estas controversias proceden de series patológicas o clínico-patológicas, y están condicionados por la metodología utilizada en cada serie. En concordancia con lo propuesto en relación con la patología de tipo Alzheimer (especialmente en casos subclínicos) (Dubois *et al.*, 2010; Montine *et al.*, 2012), en lo sucesivo se hará referencia a la EGA, generalmente como patología de granos argirófilos (PGA), salvo cuando se trate de resultados publicados como EGA.

Frecuencia y grupos de edad. La frecuencia de PGA en series de autopsia es muy variable, entre 4% (Ferrer *et al.*, 2008) y 43% (Saito *et al.*, 2002) y depende en gran medida de la distribución de los casos en cuanto a la edad de óbitos. En series longitudinales de envejecimiento y demencia, que incluyen casos con y sin trastorno cognitivo (Josephs *et al.*, 2008), las frecuencias se encuentran en un rango intermedio. Parece claro que la frecuencia de PGA se incrementa con la edad. En las primeras publicaciones, la edad de inicio media de la PGA se situó entre 75 y 80 años (Braak and Braak, 1998; Jellinger, 1998; Tolnay *et al.*, 2001). En Josephs *et al.* 2008, los pacientes con PGA y demencia no atribuible a otras patologías, presentaron una edad media de inicio de la demencia de 87 años. En centenarios la frecuencia de PGA es más elevada (Ding *et al.*, 2006), y puede alcanzar el 100% de los casos, dependiendo de las técnicas utilizadas para detectarla (Pham *et al.* 2011). En la mayoría de las series no predomina ningún sexo, salvo en Saito *et al.*, 2004, donde se describe un predominio de mujeres.

Combinación con otras patologías. La PGA se presenta con mayor frecuencia en combinación con otras patologías neurodegenerativas que de forma aislada (revisado en Ferrer *et al.*, 2008), y entre ellas destacan las taupatías esporádicas. Así, el 20% de los pacientes con PSP y el 40% de los pacientes con DCB pueden incluir PGA (Simic, 2002). En una serie reciente, se ha descrito también un 38% de PGA en casos de ELA (Soma *et al.*, 2012).

Rasgos clínicos característicos. La caracterización de un cuadro clínico en correlación con la PGA ha estado limitada por la alta frecuencia de patologías combinadas. La PGA puede asociarse a demencia en casos con niveles bajos o intermedios de otras patologías neurodegenerativas (Thal *et al.*, 2008). En Josephs *et al.* (2008), de 22 casos de GA sin otra patología asociada y Braak \leq IV, 8 presentaban demencia. De los no demenciados, un 25% presentaban un deterioro cognitivo leve. En los pacientes con demencia, predomina el inicio con trastorno de memoria. Se han descrito casos aislados con presentación como un cuadro psiquiátrico, con predominio de trastorno de conducta, o con paranoia y alucinaciones visuales (Asaoka *et al.* 2010). Los pacientes con PGA muestran trastornos cognitivos de intensidad más leve que los pacientes con EA (Steuerwald *et al.*, 2007).

EGA en casos sin demencia. La PGA puede asociarse a un nivel cognitivo conservado, especialmente si no se presenta asociada a otra patología. En Josephs *et al.* (2008) se describen 14/57 casos con PGA pura, sin demencia.

EGA en casos sin otra patología. En una minoría de casos la PGA no se asocia a otra patología relevante. En Josephs *et al.* (2008) de 57 casos con GA, sólo 22 no tenían al menos una patología asociada, con un estadio de Braak \leq IV.

1.3.2. LESIONES CELULARES CARACTERÍSTICAS

La patología de granos argirófilos (PGA) incluye en todos los casos lesiones argirófilas (granos argirófilos y *coiled bodies*) y no argirófilas [preovillos y astrocitos tau(+)], así como otras lesiones inespecíficas (neuronas balonizadas).

Granos argirófilos

Los GA fueron descritos por primera vez (Braak and Braak, 1987), mediante tinción de Gallyas y de Bodian, en una serie neuropatológica de casos de demencia (8 de 56 casos) con mínima patología de EA. Se trata de estructuras intensamente argirófilas en forma de grano de avena, fusiformes, a menudo ligeramente curvados (en forma de coma), con un eje longitudinal de hasta 9 μ y un diámetro de hasta 4 μ . Dentro del rango de variabilidad se incluyen elementos en forma de bastón o de palillo de tambor. Ocasionalmente, presentan pequeñas excrescencias en la superficie, así como prolongaciones filiformes en los polos. Característicamente, pueden observarse en el córtex entorrinal / transentorrinal, CA1, y la amígdala. Los GA del córtex entorrinal, generalmente, son de mayor tamaño que los de CA1. Los granos se encuentran dispersos en el neuropilo y no formando agregados, como las neuritas distróficas de las placas neuríticas (Braak and Braak, 1998). Sin embargo, a menudo, se disponen en hileras, unidas por finas hebras (Tolnay and Clavaguera, 2004). A diferencia de lo que ocurre con los

cuerpos de Pick (compuestos predominantemente por isoformas de tau 3R), los GA se tiñen con Gallyas, Bodian, Bielschowsky, pero no con la tinción de Campbell-Switzer (Uchihara *et al.*, 2005). Se pueden identificar con anticuerpos para tau hiperfosforilada, con anticuerpos para tau 4R (p.ej., RD4), y para ubiquitina, aunque se obtienen mejores resultados con anticuerpos para la proteína ligadora de ubiquitina p62 (Scott and Lowe, 2007). Se ha sugerido que los GA se localizan en las dendritas y en las espinas dendríticas de las neuronas (Ikeda *et al.*, 1995), y que una proporción de GA se dan en las dendritas de neuronas que contienen tau hiperfosforilada (Tolnay *et al.*, 1998; Tolnay and Clavaguera, 2004).

Preovillos

Los preovillos (pONF) acompañan de forma regular a los GA en las áreas afectadas, y se detectan mediante inmunotinción para tau hiperfosforilada, que se distribuye de forma homogénea por el dominio somatodendrítico de las neuronas. Su distribución es similar a la de los ONF en EA. También pueden ser abundantes en el GD, aunque a ese nivel es raro observar GA (Braak and Braak, 1998), y se han observado hasta en el 80% de las neuronas de CA1 con AT8 (Tolnay *et al.*, 1997). Se ha sugerido, asimismo, que en la EGA no se forman ONF, aunque sí se produce un desarrollo característico de ramificación dendrítica colateral, y que una proporción de GA se localizan en axones de neuronas con pONF (Tolnay and Clavaguera, 2004). Otros autores han sugerido que el desarrollo de ONF en CA2, y también en el n. subtalámico, es característico de EGA (Ishizawa *et al.*, 2002). En estudios post mortem mediante el trazador Dil, las neuronas con GA presentan alteraciones en el árbol dendrítico, que están ausentes en los casos con EA sin PGA (Thal *et al.* 2008).

Inclusiones oligodendrogliales tau (+)

Las inclusiones oligodendrogliales que forman parte de la PGA fueron descritas en las primeras publicaciones (Braak and Braak, 1998) como parcialmente argirófilas e inmunorreactivas para tau. Están presentes en la sustancia blanca adyacente a las áreas afectadas y en el córtex, asociados a haces de fibras milinizadas. Con frecuencia, pueden observarse en la vía perforante en todo su recorrido. Son también muy abundantes en el alveus. Sólo una pequeña proporción de oligodendrocitos en una área determinada presentan inclusiones. La morfología de estas inclusiones es idéntica a la de los *coiled bodies* (CB) característicamente asociados a otras taupatías 4R (PSP y DCB).

Inclusiones astrocitarias tau (+)

Asociadas a las inclusiones anteriores se observan, de forma regular, astrocitos inmunorreactivos para tau (AT8), no argirófilos, y que no se corresponden con la morfología de los astrocitos en penacho (PSP) ni las placas astrocitarias (DCB) (Braak and Braak, 1998; Botez *et al.*, 1999). Son más abundantes

en el córtex entorrinal anterior y la amígdala, y muestran considerable variación individual. También se han descrito como astrocitos *bush-like* (Saito *et al.*, 2004).

Neuronas balonizadas

Se trata de una lesión asociada a varias taupatías, Pick, PSP, DCB, EA, y también a ECJ. En la PGA son frecuentes en la amígdala, y en menor número en las capas V y VI del isocórtex afectado (Tolnay and Clavaguera, 2004). En la mayoría de los casos de PSP con NB, existe PGA combinada (Togo and Dickson, 2002). Las NB muestran inmunorreactividad intensa para $\alpha\beta$ -cristalina, neurofilamentos fosforilados, ubiquitina y tau.

Se ha descrito la presencia de inclusiones TDP-43 (+) en el 60% de una serie de casos de EGA, con alta correlación regional y celular con la taupatía (Fujishiro *et al.*, 2009). Así mismo, en casos de EGA se han observado datos de stress oxidativo y del retículo endoplásmico, indicativos de disfunción mitocondrial y de alteración del plegamiento de proteínas, similares a los observados en otras enfermedades neurodegenerativas (Iliev *et al.*, 2011).

1.3.3. DISTRIBUCIÓN REGIONAL Y ESTADIOS NEUROPATOLÓGICOS

En la primera descripción detallada de la neuropatología de la EGA (Braak and Braak, 1998), se observó mayor densidad de GA en CxE y CxT, más abundantes en la capa pre- β , también en la capa pre- α , y ocasionalmente en los islotes celulares de la capa pre- α . La mayor densidad de GA se observó en el límite CxE/CxT. En cuanto al hipocampo, no se observaron GA en el GD, CA2-3 y CA4, aunque sí se describen en escasa cantidad en CA2-4 en publicaciones posteriores (Tolnay and Clavaguera, 2004). En CA1, los GA afectan a las capas piramidal externa e interna, con una acusada reducción de densidad hacia *stratum oriens* y *radiatum-L-M*. La máxima densidad se observa en la región cuneiforme prosubicular, con escasa cantidad de GA en el subículum. No se observan GA en el presubiculum y sólo algunos en el parasubiculum. También se observa patología en los núcleos basolaterales de la amígdala, y en ocasiones en porciones basales del claustró. También se observan GA en el n. tuberoso lateral del hipotálamo. En cuanto a área isocorticales, se pueden observar GA en el segmento superior de la capa III del córtex temporal, porciones ánterobasales de la ínsula, neocórtex témporopolar, y órbitofrontal. En cuanto al tronco cerebral, pueden observarse escasos GA en la sustancia gris periaqueductal, los nn. anteriores del rafe, el l. coeruleus y el n. motor dorsal del par X.

La primera descripción de estadios neuropatológicos en la EGA se basó en una amplia serie de casos estudiados mediante Gallyas y AT8 (Saito *et al.*, 2004):

- Estadio 0: No se observan GA.
- Estadio I: Presencia de GA en el *gyrus ambiens*, generalmente formando agregados, y más abundantes en la porción más anterior de CA1. Puede haber afectación leve de los núcleos corticales y basolaterales de la amígdala.
- Estadio II: Clara afectación de la amígdala, con neuronas balonizadas y astrocitos *bush-like*. Se observan GA en el CxT posterior y subículus, y en el segmento más anterior del lóbulo temporal medial. Se observan preovillos en el GD, así como astrocitos *bush-like* en el *gyrus ambiens*.
- Estadio III: Presencia de GA en el córtex insular, córtex cingular anterior, *n. accumbens*, nn. septales, hipotálamo, y giros rectos más allá de los límites del lóbulo temporal. Aumento de preovillos en el GD. En las áreas afectadas se observan neuronas balonizadas dispersas. Los astrocitos *bush-like* son frecuentes en la amígdala, el *gyrus rectus* y el *n. accumbens*. El *gyrus ambiens* muestra espongiosis superficial, que también se aprecia en el n. cortical de la amígdala, CxP posterior, y polo temporal medial. En el estadio terminal es característica una intensa atrofia en la unión entre la amígdala y el lóbulo temporal anterior.

El tamaño de los GA parece aumentar con la progresión de los estadios, y el número de GA disminuye en las áreas más afectadas, aparentemente por pérdida neuronal. El porcentaje de casos con GA y el estadio se incrementan significativamente con la edad.

Posteriormente, en Thal *et al.* (2005), se utiliza un sistema de estadiaje simplificado:

- Estadio 0: No se observan GA.
- Estadio I: Presencia de GA en CA1 (no se indica el nivel ántero-posterior) y CxE en fase no argirófila, es decir, sólo escasos GA identificables mediante Gallyas.
- Estadio II: Presencia de abundantes GA Gallyas (+) en CA1 y CxE (capas pre- α y pre- β).
- Estadio III: Alta densidad de GA y progresión significativa al giro parahipocampal.

En Ferrer *et al.* (2008) se propone un esquema de progresión en cuatro estadios:

- Estadio I: Presencia de GA en CxE anterior, con afectación leve de nn. corticales y basolaterales de la amígdala. Afectación leve del n. tuberoso lateral del hipotálamo.
- Estadio II: Afectación de CxE y CA1 anterior, CxT, nn. cortical y basolateral de la amígdala, pre-subículus, n. tuberoso lateral del hipotálamo, GD.
- Estadio III: CxE, CA1, córtex perirrinal, presubículus, amígdala, giro dentado, n. tuberoso lateral del hipotálamo, afectación leve de CA2-3, afectación leve de subículus, afectación leve de otros

nn. hipotalámicos (nn. mamilares), afectación leve del córtex temporal anterior, córtex insular, cingular anterior, orbitofrontal, accumbens, nn. septales, GA infrecuentes en el mesencéfalo.

- Estadio IV: Afectación adicional, de moderada a severa, de neocórtex y tronco cerebral.

Se ha descrito afectación asimétrica de ambos hipocampos en más del 90% de los casos de PGA, con una buena correlación con los hallazgos de neuroimagen (Adachi *et al.*, 2010).

1.3.4. PATOLOGÍA MOLECULAR DE LAS TAUPATÍAS 4R

El perfil electroforético de tau en PSP es diferente del observado en EA, con su triplete característico de 55, 64 y 69 Kd (y una cuarta banda de menor intensidad de 74 kd). En PSP se ha observado regularmente un doblete de 64 y 69 Kd, igualmente con una banda menor de 74 kd. No se han observado isoformas de tau sin exón 10 (revisado en Buée *et al.*, 2000). El perfil de tau observado en la DCB es similar al de PSP, y se describe como un doblete de 64 y 69 kd. Sin embargo, es posible que los componentes sean diferentes, puesto que estas dos bandas no se detectan mediante anticuerpos frente a la región codificada por el exón 3. Tampoco se han identificado en DCB isoformas sin exón 10. Así, pues, tanto en PSP como en DCB predominan las isoformas 4R.

En casos de EGA sin patología de tipo EA avanzada se ha detectado un patrón de tipo 4R, tanto mediante inmunotinción con anticuerpos RD4 como con Western blot. Togo *et al.* (2002), detectaron GA mediante anticuerpos RD4 pero no RD3. En los casos con estadio de Braak bajo, mediante Western blot se detectaron dos bandas principales alineadas con tau 4R (con o sin exón 2), y una banda menor alineada con tau 3R con exón 2. Se observó un patrón distinto en 2 casos con estadio de Braak más alto. En casos con estadio de Braak bajo, Tolnay *et al.* (2002), detectaron dos bandas de 64 y 69 kd y una banda menor de 74 kd en un caso con estadio de Braak I, mientras que en casos con Braak II y III se observaba además una banda menor a 60 kd. Zuhareva *et al.* (2002), mediante microscopía electrónica, detectaron filamentos rectos de 9 a 22 nm, que se tiñen en inmunohx con PHF-1. En preparaciones procedentes de sustancia blanca, además, se observaron filamentos más finos, de 9 a 10 nm, que no son inmunorreactivos para PHF-1. Asimismo, mediante Western blot detectaron dos bandas de 69 y 64 kDa .

En conjunto, hasta el momento no se ha observado diferencia entre el patrón detectado en EGA y el observado en PSP o DCB. Sin embargo, se han sugerido diferencias entre PSP y DCB, en cuanto a la presencia de isoformas de tau truncadas en esta última entidad (Arai *et al.*, 2004).

En EGA se han observado proteínas-quinasas fosforiladas asociadas a las inclusiones neuronales y gliales características, como *mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinases* (MAPK/ERK), *stress-activated protein kinases* (SAPK/JNK), *p38 kinases* y *glycogen synthase kinase-3 β* (GSK-3 β) (Ferrer et al., 2003).

1.4. PATOLOGÍA COMBINADA EN TAUPATÍAS

1.4.1. COMBINACIÓN DE TAUPATÍAS ESPORÁDICAS

Aunque existen rasgos neuropatológicos bien definidos que permiten identificar la PSP, la DCB, la EGA, la E. de Pick y otras taupatías, es sabido que con frecuencia se observa combinación o solapamiento de las lesiones que las caracterizan. Esta combinación es más frecuente entre las taupatías 4R. En una serie de 32 casos de PSP, Keith-Rokosh and Ang (2008) describen sólo un 22% de casos sin patología combinada, 28% de casos con EGA, 32% con rasgos de DCB asociados (placas astrocitarias, y neuronas balonizadas no limitadas a áreas límbicas), y 19% de casos con EGA y rasgos de DCB. Es más infrecuente la combinación entre patologías 3R y patologías 4R, como, p. ej., entre E. de Pick y PSP (Wang *et al.*, 2006). Mientras que entre PSP y DCB se considera que existe un continuo de variación que comparte rasgos fenotípicos de ambas entidades, en cuanto al tipo de lesión celular subyacente y a las regiones cerebrales afectadas (Wakabayashi *et al.*, 2004, Dickson *et al.*, 2011), la EGA se describe como una entidad fenotípicamente más estable que se combina principalmente con las otras taupatías 4R. En conjunto, el 20% de los pacientes con PSP y el 40% de los pacientes con DCB contienen patología de GA (Simic, 2002), y en estos casos combinados se han descrito lesiones de tipo GA en área distintas de las regiones clásicas de distribución en la EGA. La presencia de NB en áreas límbicas en PSP suele asociarse a patología de GA (Togo *et al.*, 2002).

1.4.2. PATOLOGÍA DE TIPO ALZHEIMER EN TAUPATÍAS ESPORÁDICAS

El incremento de la patología de tipo Alzheimer con la edad implica su frecuente combinación con otras patologías neurodegenerativas asociadas a edad avanzada, incluidas las taupatías. En la serie de Gearing *et al.* (1994), el 46% de los casos de PSP cumplían criterios CERAD para EA definitiva o probable. En la serie de Keith-Rokosh *et al.* (2008), de 32 casos de PSP, el 69% presentaron patología de EA, el 34% con estadio de Braak >II. Se observó correlación del estadio de Braak con la edad. Así, pues, se identificó un 19% de casos con EA definitiva o probable según criterios CERAD. Los autores indican que puede ser difícil asignar un estadio de Braak en presencia de cambios de PSP, ya que algunas de

las áreas evaluadas en el estadiaje de Braak pueden contener ONF en la PSP, y recomiendan aplicar la densidad de placas neuríticas. En contra de este criterio, en el estudio previamente citado de Lace *et al.* (2009), se incluyen 5 casos con taupatías no EA (Pick, PSP), que no modifican los resultados de microestadiaje de la patología tau en el LTM.

En los casos de EGA, la distribución de las placas de amiloide se correlaciona con la edad de los pacientes y con el estadio de Braak (Tolnay *et al.*, 1999). La EGA es frecuente en casos de EA. Fujino *et al.* (2005) observaron patología de GA en 26% de casos de EA mediante anticuerpos frente a tau 4R. No se observó correlación con el estadio de Braak, aunque sí con la edad de los pacientes. Ambas patologías, en combinación, pueden contribuir al desarrollo de demencia. En una serie de casos con patología de GA, con o sin demencia en evaluación 1-4 semanas pre mórtem, los casos con PGA y demencia mostraron estadios de Braak más avanzados que los casos sin demencia, y en los estadios intermedios de Braak (III-IV), era más frecuente la demencia entre los pacientes que asociaban PGA (Thal *et al.*, 2005). Así, pues, La PGA tiene un efecto sumatorio (o de descenso del umbral) para el desarrollo de demencia cuando se combina con otras patologías, fundamentalmente EA.

En los estudios de patologías combinadas de tipo EA y GA se ha observado una frecuencia alta de ONF en CA2 (Ishizawa *et al.*, 2002; Thal *et al.*, 2005), y se ha discutido a cuál de las dos patologías es atribuible.

1.5.GENÉTICA DE LAS TAUPATÍAS ESPORÁDICAS

El riesgo genético de PSP está determinado en parte por variantes de un polimorfismo de inversión de 1 Mb, que contiene varios genes, incluido *MAPT*, el gen que codifica la proteína tau (Stefansson *et al.*, 2005). Las variantes de inversión se denominan H1 y H2, y es el haplotipo H1 el que confiere riesgo para PSP (Baker *et al.*, 1999), y especialmente el subhaplotipo H1c, reconocido por el SNP rs242557 (Pitmann *et al.*, 2005; Rademakers *et al.*, 2005). H1 también contribuye al riesgo de DCB (Cruchaga *et al.*, 2009; Houlden *et al.*, 2001) y del complejo ELA/parkinsonismo con demencia de Guam (Sundar *et al.*, 2007). Igualmente, se ha demostrado la contribución de H1 al riesgo de E. de Parkinson (Simon-Sanchez *et al.*, 2009). En relación con la EA, sólo se ha observado asociación de H1 con uno de los fenotipos atípicos (Murray *et al.*, 2011). En un estudio de GWA de casos con confirmación neuropatológica de PSP y DCB, ningún gen mostró un grado de asociación superior a *MAPT* (Höglinger *et al.*, 2010).

También se ha observado un mayor riesgo de PSP, DFT-tau y E. de Parkinson en los portadores del alelo Q en el polimorfismo Q7R del gen de la saitohina, localizado en el intrón situado entre los exones 9 y 10 de MAPT (Conrad *et al.*, 2004).

En cuanto al gen *APOE* (cromosoma 19), el alelo e4 confiere riesgo para el desarrollo de EA, se asocia a un inicio más temprano de la enfermedad y a una mayor carga de β -amiloide en tejido, mientras que el alelo e2 tiene un efecto protector (Verghese *et al.*, 2011). En EGA, se ha descrito una mayor proporción de e2 en varias series basadas en poblaciones centroeuropeas (Ghebremedhin *et al.*, 1998; Tolnay *et al.*, 1998; Ghebremedhin *et al.*, 2002), que no se confirmó en una serie basada en población norteamericana (Togo *et al.*, 2002). También se ha descrito una influencia del polimorfismo de *APOE* sobre las distintas formas de presentación clínica de la DFT, (Short *et al.*, 2002), así como un mayor grado de atrofia cerebral en la evolución de EA y DFT en portadores del alelo e4 (Agosta *et al.*, 2009). Sin embargo, en estos últimos estudios no se incluyó confirmación patológica post mortem de los diagnósticos.

En relación con las taupatías de origen genético, sólo se ha identificado hasta el momento un caso con la mutación S305I en *MAPT*, en el que se observaron hallazgos de tipo PGA (Kovacs *et al.*, 2007).

1.6. TRANSMISIBILIDAD DE PROTEÍNAS: MODELOS PATOGENICOS EN TAUPATÍAS.

En los últimos años, se ha puesto de manifiesto en distintos modelos experimentales (animales transgénicos, cultivos celulares) que las proteínas asociadas a enfermedades neurodegenerativas (beta-amiloide, tau, alfa-sinucleína, TDP-43, entre otras) comparten algunas características con los priones en cuanto a sus propiedades moleculares (derivadas fundamentalmente de su mal plegamiento) y a su transmisibilidad transináptica de neurona a neurona. Estos hallazgos han sido acogidos con entusiasmo como una posible base explicativa para la distribución de la patología en distintas enfermedades neurodegenerativas de acuerdo con estadios sucesivos de progresión (Alzheimer, Parkinson, Huntington, ELA, DFT) (Braak *et al.*, 2006; Braak *et al.*, 2003; Ravits *et al.*, 2009). Recientemente, se ha sugerido la sustitución de términos más genéricos como “prionoide” o “prion-like” (Aguzzi and Rajendran, 2010) por el de propagación (*spread*) y moldeamiento (*templating*) de proteínas para describir este conjunto de evidencias experimentales (Hardy and Revesz, 2012).

La propagación experimental de proteína tau se demostró por primera vez mediante la inyección intracerebral de extractos cerebrales que contenían tau patológica agregada (mutación P301S) a ratones transgénicos que expresaban tau humana *wild-type* (Clavaguera *et al.*, 2009). El estudio mor-

fológico mostró la presencia de agregados de tau en forma de ONF, HN y CB en regiones cerebrales distantes de la zona de inoculación, si bien en relación de conectividad con ella. La localización estrictamente intracelular de los agregados (en contraste con los depósitos extracelulares, p.ej., de A β y PrP) sugiere que la proteína anómala se transmite directamente de célula a célula. En concordancia con esta hipótesis, varios estudios in vitro en cultivos celulares han demostrado la captación de tau extracelular por parte de células que posteriormente desarrollan agregados intracelulares de tau (Frost *et al.*, 2009; Nonaka *et al.*, 2010; Guo and Lee, 2011). Estos agregados intracelulares llegan a extenderse a todas las células del cultivo. Recientemente, dos grupos de investigación han generado ratones transgénicos que sobreexpresan tau mutada selectivamente en el CxE, y han demostrado que en ellos la patología tau (+) se propaga a áreas cerebrales que no expresan tau humana, y donde los depósitos de tau agregada dan lugar a degeneración sináptica, daño axonal y muerte neuronal (de Calignon *et al.*, 2012, Liu *et al.*, 2012). Se han propuesto diversos mecanismos posibles para la transmisión intercelular de agregados de tau, entre los cuales el más relevante podría ser la generación e internalización de exosomas (Aguzzi and Rajendran, 2010).

El microestadiaje de la patología tau (+) en la FH, propuesto por Lace *et al.* (2009), a diferencia de la patología A β observada, incluyendo las PN, es compatible con la propagación de la patología a partir de los cambios iniciales observados en el CxE lateral y CxT a través de circuitos conocidos del HC. También H. Braak ha reformulado recientemente su sistema de estadiaje de la patología neurofibrilar sobre la base una hipotética propagación de tau patológica a través de circuitos neurales (Braak and Del Tredici, 2011b).

La utilización de trazadores en tejido post mortem (Dil) ha permitido demostrar la conectividad entre neuronas afectadas por PGA en el CxE y en el isocórtex temporal adyacente (AB 35) (Thal *et al.* 2008). Mientras que en los casos con patología de EA significativa, con y sin demencia, se observó desconexión a este nivel, los casos con PGA y estadio de Braak < IV mantenían la conectividad, si bien presentaban importantes alteraciones del árbol dendrítico, además de la presencia de GA a ese nivel.

Por último, en un modelo de bioensayo similar al utilizado habitualmente para testar cepas de priones, se ha desarrollado lesiones características de varias taupatías, incluida la EGA, mediante inoculación intracerebral de extractos de tejido humano a ratones transgénicos (Clavaguera *et al.*, 2013).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1. Estudiar las características sociodemográficas, clínicas y neuropatológicas de una serie de casos con patología de granos argirófilos procedentes de varios Bancos de Tejidos Neurológicos.
2. Analizar las características diferenciales de los casos con patología de granos argirófilos en relación con las series de origen, y en particular con la serie de taupatías de origen, incluidos los casos de Alzheimer.
3. Analizar, en dicha serie, la combinación de la patología de granos argirófilos con otras patologías neurodegenerativas, y en particular con otras taupatías y con la patología de tipo Alzheimer.
4. Estudiar en detalle la distribución regional de los distintos componentes de la patología de granos argirófilos en el lóbulo temporal medial, y su posible interpretación mediante un esquema de estadios neuropatológicos sucesivos.
5. Analizar las posibles homologías y divergencias entre la progresión de la patología de tipo Alzheimer y la distribución de la patología de granos argirófilos.
6. Estudiar la expresión génica del córtex entorrinal en sujetos sin patología neurodegenerativa.
7. Estudiar las características moleculares de la proteína tau y de los agregados de tau en casos con patológica de granos argirófilos.
8. Estudiar la patología dendrítica en neuronas con agregados intracelulares de tau hiperfosforilada.
9. Analizar las características genéticas de los casos con patología de granos argirófilos (polimorfismos APOE y H1/H2 del gen *MAPT*, en comparación con poblaciones de control.
10. Analizar las posibles implicaciones de los hallazgos para un modelo patogénico de propagación de la patología de granos argirófilos.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.SERIES DE CASOS

Los datos clínico-patológicos y las muestras biológicas de los distintos estudios incluidos en esta tesis proceden de series consecutivas de donaciones de tejido cerebral y casos de consulta recibidos por tres bancos de tejidos neurológicos entre el 1/01/1996 y el 12/12/2012. Se han incluido únicamente los casos i) con edad al exitus ≥ 50 años, y/o ii) con diagnóstico neuropatológico de enfermedad neurodegenerativa, y iii) con estudio neuropatológico post mortem completo (ver Aps. 3.2 y 3.3), iv) incluyendo inmunotinción para tau en regiones isocorticales y LTM. La **Tabla 1** muestra los datos principales de las distintas series de referencia, y los casos de PGA y EA obtenidos a partir de cada una de ellas.

Tabla 1. Series de casos de referencia, distribución por biobancos de origen.

Biobanco	N	Edad (x, DT)	Sexo (V:M)	Periodo	EA (%)	PGA (%)
BT-CIEN	217	78,4 (11,8)	1 : 1	2007 - 2012	103 (47,5)	19 (8,8)
BCRM	70	74,7 (12,5)	1 : 1,2	2007 - 2012	37 (52,9)	8 (11,4)
BTIN - HUFA	224	72 (11,6)	1 : 1,1	1996 - 2009	82 (36,6)	26 (11,6)
Total	511	74,9 (12,1)	1 : 1,1	1996 - 2012	222 (43,4)	53 (10,4)

BT-CIEN : Banco de Tejidos CIEN (Fundación CIEN, Instituto de Salud Carlos III, Madrid), incluye casos de donación de tejido cerebral y casos de consulta de otros bancos de cerebros.

BCRM: Banco de Cerebros de la Región de Murcia, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia. Incluye casos de donación extrahospitalaria y casos de autopsia clínica hospitalaria, tras donación del tejido.

BTIN-HUFA: Banco de Tejidos para Investigación Neurológica – Hospital Universitario Fundación Alcorcón. Incluye casos de donación extrahospitalaria, casos de autopsia clínica tras donación, y casos con sospecha clínica de enfermedad priónica (centro de referencia para varias Comunidades Autónomas).

La distribución de los casos por el diagnóstico neuropatológico principal se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Distribución de los casos por diagnóstico neuropatológico principal en las series de origen [n (%)].

Banco	Alzh	Vasc	Lewy	Taupat	TDP	EETH	Hunt	AMS	Otros	Contr	Total
BT-CIEN	103 (47,5)	17 (7,8)	21 (9,7)	17 (7,8)	33 (15,2)	0 (0)	5 (2,3)	4 (1,8)	9 (4,2)	8 (3,7)	217
BCRM	37 (52,9)	1 (1,4)	11 (15,7)	3 (4,3)	10 (14,3)	0 (0)	2 (2,9)	0 (0)	0 (0)	6 (8,6)	70
BTIN-HUFA	82 (36,6)	13 (5,8)	27 (12,1)	28 (12,5)	24 (10,7)	33 (14,7)	3 (1,3)	7 (3,1)	5 (2,2)	2 (0,9)	224
Total	222 (43,4)	31 (6,1)	59 (11,5)	48 (9,4)	67 (13,1)	33 (6,5)	10 (2)	11 (2,2)	14 (2,7)	16 (3,1)	511

3.2.PROCEDIMIENTOS NEUROPATOLÓGICOS BÁSICOS

Todos los casos incluidos en el estudio fueron procesados de acuerdo con un protocolo básico común de banco de cerebros. Este protocolo implica la realización de una autopsia rápida limitada a la cavidad craneal, con extracción adicional de la médula espinal en casos con patología medular conocida (enfermedad de neurona motora). Inmediatamente tras la extracción del encéfalo, se realiza una sección sagital media y se obtienen dos hemiencéfalos simétricos, izquierdo y derecho, respectivamente. El hemiencéfalo izquierdo se introduce en formaldehído tamponado (tampón fosfato) al 4% y se fija durante al menos 4 semanas previamente a su tallado. El hemiencéfalo derecho se procesa íntegramente para congelación inmediata y almacenamiento a largo plazo. Para ello se realizan lonchas protocolizadas coronales del hemisferio cerebral, y sagitales del hemisferio cerebeloso. El tronco se congela en bloque. El material congelado se mantiene en arcones de -80°C durante un periodo indefinido. En cada caso se registra el intervalo transcurrido entre el exitus y la congelación del tejido como intervalo post mortem (IPM). Durante la extracción del tejido se obtiene una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) intraventricular, en la que se mide el pH, como parámetro de calidad del tejido, previamente a su centrifugación, alicuotado y congelación a largo plazo.

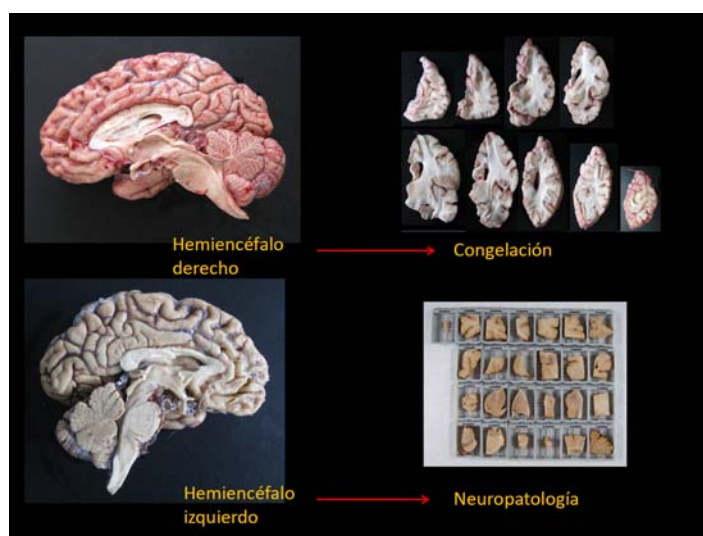


Figura 4. Protocolo común de procesamiento inmediato del tejido tras la extracción.

Una vez fijado el hemiencéfalo izquierdo (3-4 semanas), se realiza el tallado y la toma de muestras para estudio histológico. De forma rutinaria, se obtienen 25 bloques de tejido correspondientes a diferentes áreas corticales y subcorticales, de acuerdo con criterios de diagnóstico neuropatológico de consenso. Ocasionalmente, se obtienen bloques adicionales sobre la base de hallazgos macroscópicos específicos (lesiones focales, áreas de atrofia, etc.). Todos los bloques obtenidos se procesan

para inclusión en parafina en un procesador automático, y de ellos se obtienen mediante microtomía cortes de parafina de 5 μ , que se tiñen mediante diferentes técnicas histológicas.

Los casos con sospecha clínica de enfermedad priónica se procesaron exclusivamente en el HUFA de acuerdo con los protocolos de bioseguridad correspondientes (V.V.A.A, Ministerio de Sanidad y Consumo, 2013). En estos casos se obtuvieron para congelación bloques de tejido fresco de lóbulo frontal, lóbulo parietal y hemisferio cerebeloso derechos, y el resto del tejido se fijó de acuerdo con el protocolo descrito.

3.3.MÉTODOS HISTOLÓGICOS

Todos los casos de las series de referencia fueron estudiados mediante un panel de técnicas histológicas, incluyendo una batería de inmunohistoquímica, de acuerdo con las patologías en estudio, con vistas a su clasificación y estadiaje neuropatológicos. La **Fig. 4 (Material Suplementario)** muestra las técnicas realizadas de rutina en los distintos bloques de tejido.

En la serie de casos con PGA se realizaron técnicas adicionales en los bloques de amígdala, hipocampo anterior, y cuerpo del hipocampo: i) tinción argéntica de Gallyas (**Artículos Publicados, Rábano et al., in press**), e ii) inmunotinción con la batería de anticuerpos que se incluyen en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados en las tinciones inmunohistoquímicas del LTM.

Anticuerpo	Clon	Proveedor	Rec. antigénica	Concentración
Anti-tau AT8	AT8	Thermo-Fisher	Olla (citrato sódico)	1/100
Anti-tau AT100	AT100	Thermo-Fisher	Olla (citrato sódico)	1/100
Anti tau PHF-1	PHF-1	P. Davies	Olla (citrato sódico)	1/100
Anti-tau 7.5	7.51	Claude M. Wischik	Olla (citrato sódico)	1/100
Anti-tau 3R	8E6/C11	Thermo-Fisher	Olla (citrato sódico)	1/3000
Anti-tau 4R	1E1/A6	Thermo-Fisher	Olla (citrato sódico)	1/100
Anti-A β	6F/3D	Dako Labs.	Olla + ácido formico	1/40
Anti-ubiquitina	Policlonal	Dako Labs.	No	1/1000
Anti-p62	Policlonal	Thermo-Fisher	No	1/300
Anti-TDP-43	2E2/D3	Thermo-Fisher	Olla + ácido formico	1/400
Anti- α - β -cristalina	Policlonal	Chemicon	No	1/1000
Anti-NF SMI 1	SMI-312	Dako Labs.	No	1/2000

3.4.VARIABLES CLÍNICAS Y NEUROPATOLÓGICAS

Variables sociodemográficas y clínicas

Sexo, edad al exitus, edad de inicio y tiempo de evolución (del cuadro clínico principal), sospecha clínica de ECJ. Las variables clínicas se obtuvieron de la evaluación de la documentación clínica disponible. En el caso de que la información disponible resultara insuficiente para la evaluación de alguna variable, esta se registró como no valorable (NV).

Variables neuropatológicas

1) Clasificación neuropatológica

- Diagnóstico neuropatológico principal.
- Diagnósticos neuropatológicos combinados (secundarios).
- Grupo de patología principal: Alzheimer, vascular, Lewy, taupatía, TDP-43, EETH, Huntington, AMS, ataxias, otras patologías.
- Frecuencia de placas neuríticas (CERAD)(Mirra *et al.*, 1991). Estadio de Braak (tau) (Braak *et al.* 2006). Estadio de Braak limitado al LTM (Lace *et al.*, 2009). Clasificación NIA (ABC) (Montine *et al.*, 2012).
- Estadio de Braak (alfa-sinucleína) (Braak *et al.*, 2003). Patrón de patología de Lewy (tipo de DCL).
- Patología vascular (superficial, macroscópica, y patología de pequeño vaso).
- Esclerosis del hipocampo (presencia / ausencia).
- Presencia de inclusiones TDP-43 (+) en el LTM.

El diagnóstico de todas las patologías se realizó de acuerdo con criterios de diagnóstico y clasificación neuropatológica de consenso (Montine *et al.*, 2012).

2) Evaluación de la patología GA:

- Densidad de GA, frecuencia de preovillos (pONF), frecuencia de ovillos (ONF), frecuencia de inclusiones oligodendrogiales (CB).
- Estadio de GA de acuerdo con Thal *et al.* (2005).

Cada una de estas variables fue evaluada mediante una escala semicuantitativa de 0-3.

Las áreas en las que se evaluó la patología GA (frecuencia de GA, pONF y ONF) aparecen sombreadas en el siguiente esquema, que corresponde a los niveles representados en la **Fig. 5**:

Nivel (bloque)	Núcleos	Cx entorrinal	Cx perirrinal	Subíulum	CA1	CA2-3	G. dentado
Amígdala							
Hipocampo anterior							
Hipocampo (cuerpo)							

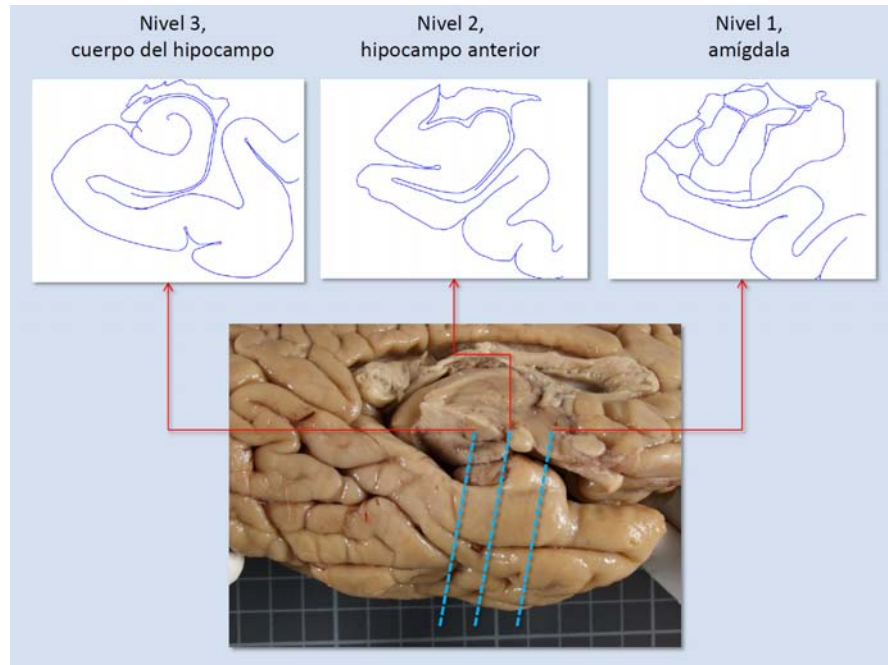


Fig. 5. Niveles coronales del LTM en los que se realizó la evaluación de la patología GA y áreas evaluadas en cada nivel de estudio.

Se evaluó en todos los casos la presencia y la frecuencia de GA en el hipotálamo posterior y en el **n. accumbens** del estriado. La metodología completa está recogida en **Artículos Publicados, Rábano et al., submitted**.

Variables genéticas

- Haplotipo de *APOE*, y H1/H2.

3.5. ESTUDIO DE EXPRESION GÉNICA

Para el análisis diferencial de expresión génica entre las capas superiores e inferiores del CxE, se utilizaron, respectivamente, muestras de 4 sujetos (análisis de *microarrays*) (3 mujeres y un varón, con edades comprendidas entre 54 y 72 años, media de 65,5 años) y 7 sujetos (Western blot) sin evidencia clínica ni neuropatológica de enfermedad neurodegenerativa. El IPM medio era de 6 horas. Se tomaron muestras de tejido congelado de CxE (AB 28), en un plano coronal equivalente al nivel 27 del Atlas Paxinos (Mai *et al.*, 2004). Mediante microdissección bajo estereomicroscopio, se tomaron mues-

tras correspondientes a CxE superior, CxE inferior y CxE total, tomando como límite la localización teórica de la capa IV del CxE. A partir de los fragmentos de tejido, se obtuvieron muestras de RNA, cDNA y cRNA biotinilado, que fueron hibridadas sobre un GeneChip Human U133Plus2.0 Genome Array. Los datos obtenidos fueron analizados mediante software GeneSpring GX, utilizando RMA y el método de normalización global de la mediana. La expresión diferencial entre distintos niveles del CxE fue evaluada mediante análisis bioinformático. Para detectar la expresión de los genes *MGP*, *FEZF2*, *SEMA 3C*, *TAGLN* y *RXFP1* se realizó análisis de PCR cuantitativa mediante oligonucleótidos específicos, empleando β -actina para normalizar las cantidades totales de RNA. La detección de las proteínas correspondientes se realizó mediante Western blot, de acuerdo con el protocolo al que hace referencia el Ap. 3.6 Los detalles de los métodos están descritos en **Santamaria et al., 2010. (Artículos Publicados)**

3.6. EXTRACCIÓN DE TAU Y WESTERN-BLOT

Esta parte del estudio se realizó en dos fases. La primera se realizó sobre la serie de 16 pacientes con PGA incluidos en **Rábano et al., 2013, Artículos Publicados**). La Tabla 1 del artículo de referencia incluye los datos de clasificación de los pacientes, con estadios de Braak (tau) entre II y IV. Se tomaron bloques de tejido de hipocampo anterior para estudios de Western y aislamiento de fibras: Paciente 1 (PGA sin otra patología neurodegenerativa), Paciente 8 (PGA asociada a PSP), Paciente 12 (PGA asociada a ELA), y Paciente 13 (PGA asociada a EH). En todos ellos, el estadio de Braak para patología tau era igual o inferior a III, y ninguno de ellos presentaba densidad significativa de placas neuríticas ni cumplía criterios NIA de probabilidad intermedia o alta de patología de tipo Alzheimer (Montine et al., 12).

En una segunda fase, a partir de la serie completa de casos con PGA (n=53) se seleccionaron nuevos casos (n = 8) sin placas neuríticas y con estadio de Braak \leq II (sin E. de Alzheimer, según criterios NIA). Para esta fase del estudio se tomó, en cada caso, una muestra de tejido congelado limitada a córtex entorrinal, y una muestra selectiva de CA1.

Los métodos de obtención de extractos de tejido cerebral y de realización de Western blot se encuentran recogidos en **Rabano et al., 2013 y Rabano et al., in press; Artículos Publicados**. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: AT8, 7.51, PHF-1, AT100, Tau 3R, and Tau 4R.

3.7. AISLAMIENTO DE FIBRAS E INMUNOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Los agregados de tau obtenidos a partir de muestras de pacientes (las mismas muestras en las que se realizó Western blot) se aislaron utilizando la metodología descrita previamente por Greenberg y Davies para PHF-tau (Greenberg *et al.*, 1990; Perez *et al.*, 1998). Los agregados de tau insolubles en detergente se visualizaron mediante microscopía electrónica. Se realizaron técnicas de inmunomicroscopía electrónica empleando los anticuerpos monoclonales AT8 y PHF-1 como anticuerpos primarios. Las preparaciones se visualizaron mediante un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1200EX operado a 100kV. Se obtuvieron imágenes con un aumento de 50.000x.

3.8. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS MEDIANTE INYECCIÓN INTRANEURONAL.

Se estudiaron 5 casos procedentes de los biobancos del Hospital de Bellvitge (Barcelona), del Banco de Tejidos CIEN (Madrid), y del Biobanco del Hospital Clinic-IDIBAPS (Barcelona).

Se utilizaron muestras de tejido cerebral fijadas en paraformaldehído (PFH) al 4% frío en PBS inmediatamente tras la extracción del cerebro. A partir de los primeros bloques de tejido se obtuvieron bloques de menor tamaño (10 x 10 x 10 mm), que se postfijaron en PFH al 4% durante 24 horas a 4°C. A continuación se obtuvieron cortes de vibratomo de 250 μ a partir de estos bloques. Estos cortes fueron teñidos mediante DAPI para identificar los núcleos celulares. Se realizaron a continuación inyecciones de Lucifer-Yellow (LY) en neuronas piramidales de distintas localizaciones (córtex del hipocampo, córtex entorrinal, córtex parahipocampal). Posteriormente, las secciones fueron incubadas con un anticuerpo de conejo frente a LY y, a continuación, con los anticuerpos monoclonales AT8 o PHF-1. La amplificación y el revelado se realizó mediante un anticuerpo secundario biotinilado y streptavidina ligada a Alexa fluor 488.

Los cortes se visualizaron mediante un microscopio láser confocal de barrido incorporado a un microscopio de fluorescencia. Mediante un objetivo de inmersión 63x (AN 1.40, índice de refracción 1.45), y utilizando un factor de zoom óptimo de 2.3, se obtuvieron pilas de imágenes de 10-100 planos de imagen (tamaño del voxel: 0.057 x 0.057 x 0.28 μ m; area: 58.36 x 58.36 μ m). Tras la adquisición, se abrieron las pilas mediante el software de procesamiento tridimensional de imágenes Imaris 7.1.

La densidad de las espinas dendríticas se estableció como el número de espinas dendríticas observadas a lo largo de un segmento de dendrita de 10 μ m de longitud. El volumen de las espinas se estimó mediante un método previamente descrito (Benavides-Piccione *et al.*, 2012). De forma resumida, se crearon superficies con 7-10 distintos umbrales de intensidad para cada pila de imágenes, y poste-

riormente se seleccionó aquella superficie sólida que coincidía exactamente con el contorno de cada espina dendrítica. Cada dendrita se rotó en 3D y se examinó para asegurar que la superficie sólida seleccionada para cada espina dendrítica era adecuada. Rotando la imagen en 3D, se midió individualmente la longitud de las espinas dendríticas, desde su inserción en el tallo dendrítico hasta la punta distal de la espina.

Los datos de clasificación de los pacientes se presentan en la **Tabla 4**:

Paciente	P9	P11	P12	P13	P14
Sexo/Edad	Varón/82	Varón/75	Mujer/82	Varón/83	Mujer/87
Patología NF/Aβ	EA	EA + EGA	EA + c. Lewy	EA + c. Lewy	EA
Estadio de Braak /frecuencia PN	V/C	III/B	V/C	V/C	III-IV/0-A
IPM (hrs.)	3	2-2:30	2	2:30	1:30
Causa de muerte	Bronconeumonía e insuficiencia cardíaca	Trastorno linfoproliferativo	Insuficiencia cardíaca	Insuficiencia respiratoria	Infección respiratoria

3.9. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Se aisló DNA total a partir de muestras de tejido cerebral (cerebelo) utilizando procedimientos estándar. El genotipado del polimorfismo *MAPT* rs1052553, que discrimina entre los haplotipos H1 y H2 de *MAPT*, se determinó utilizando sondas Taqman (C—7563736_10 assay, Applied Biosystems, Life Technologies Corp., Carlsbad, California) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El genotipado de APOE (rs429358 and rs7412) se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) (Calero *et al.*, 2009).

Como control de APOE se utilizó una serie de 694 sujetos sin enfermedad neurológica (68-85 años) incluidos en Proyecto Vallecas, un estudio longitudinal de envejecimiento/deterioro cognitivo desarrollado actualmente en la Fundación CIEN. Como control de la prevalencia de los alelos H1 y H2 en población española, se utilizaron datos publicados (Bullido *et al.*, 2000; Combarros *et al.*, 2003), así como datos procedentes del Proyecto Vallecas.

El cálculo de Odds Ratio (OR) y el valor de significación fue realizado utilizando el estadístico Chi cuadrado utilizando el programa GraphPad Prism v4. El equilibrio de Hardy-Weinberg de las distribuciones genotípicas de las poblaciones control fue realizado mediante el análisis de la distribución de las frecuencias genotípicas observadas frente a las esperadas con un nivel de significación basado en una distribución de chi cuadrado con un grado de libertad.

3.10. ASPECTOS ÉTICOS

Los casos incluidos en los diversos estudios aquí presentados proceden de tres bancos de tejidos neurológicos autorizados por las autoridades sanitarias de las correspondientes Comunidades Autónomas, y que figuran en el Registro Nacional de Biobancos (Instituto de Salud Carlos III). Sus prácticas son acordes con el RD de Biobancos (1716/2011) y con las Guías de Buenas Prácticas disponibles (ISBER, OCDE) sobre uso de muestras humanas para investigación. Todos los estudios aquí incluidos han sido aprobados por los Comité Éticos de Investigación de referencia de los centros participantes (Comité Ético de la Fundación CIEN, Comité Ético de Investigación y Bienestar Animal del ISCIII, y Comité de Bioética del CSIC).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1.DATOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS

La serie de PGA incluye 53 casos, de un total de 511 (10,4%), y la proporción de PGA varía entre el 8,8 % (BT-CIEN) y el 11,6% (BTIN-HUFA) con respecto a cada una de las series parciales de casos de origen. La **Tabla 1** y la **Tabla 2** (Ap. 3.1.) muestran las diferencias entre las series en cuanto a la edad al exitus y la distribución de patologías principales. La serie de PGA incluye 28 mujeres (52,8%) y 25 hombres (47,2%), con una ratio V/M de 1:1,12.

Tabla 5 Datos sociodemográficos y clínicos, distribución por patología principal asociada.

Patología 1ª asociada	PSP	DCB	DLFT-tau	Lewy	TDP-43	AMS	Hunt	Alzh	Vasc	Total
N (%)	12 (22,6)	6 (11,3)	3 (5,6)	4 (7,6)	4 (7,6)	1 (1,9)	1 (1,9)	12 (22,6)	10 (18,9)	53 (100)
% + PGA	57,1	42,9	25	8,2	6	9,1	10	6,3	32,3	10,4
Sexo (V:M)	1,75:1	1:1	3:1	5:1	1:3	M	V	1: 2,25	1:4,5	1:1,1
Edad éxitus (\bar{x} , DT)	72,6 (6,9)	77,5 (7,4)	74,3 (2,1)	82,3 (8,8)	71 (3,9)	72	51	86 (7,7)	84,2 (7,3)	78,7 (9,6)
Edad inicio (\bar{x} , DT)	65,1 (5,3)	73,8 (6,7)	64,5 (3,5)	72,8 (9,5)	68,3 (4,5)	-	-	75,4 (7,1)	78,2 (5,9)	71 (9,1)
T evolución (\bar{x} , DT)	7,6 (4,2)	5,1 (3,2)	-	12 (5,7)	1,8 (0,3)	-	-	8,44 (5,4)	4,7 (4,9)	7,2 (5,1)
Tr. Cogn. (%)	60	100	100	25	0	0	100	100	70	68

En ningún caso, la PGA se presentó como patología aislada, aunque en 10/53 casos no se observó ninguna patología neurodegenerativa asociada. Estos casos muestran patología vascular significativa, si bien, desde el punto de vista de la patología neurodegenerativa, pueden ser considerados como EGA “pura”. Las patologías neurodegenerativas principales más frecuentes fueron EA (22,6%) y taupatías esporádicas, PSP (22,6%) y DCB (11,3%), y las menos frecuentes AMS y E. de Huntington (1,9% cada una). En cuanto a la frecuencia de PGA en cada una de las patologías neurodegenerativas asociadas, las más altas se observaron en taupatías esporádicas, PSP (57,1%) y DCB (42,9%). Las edades al éxitus fueron más elevadas en los casos de EA, patología vascular y DCL.

Entre los casos de taupatía esporádica, 2/6 casos de DCB (17 y 19) mostraban un fenotipo incompleto de DCB, y entre los 3 casos de DLFT-tau se encontraba un caso de E. de Pick. Los casos con patología

de tipo Lewy incluían un caso de DCL y 3 de E. de Parkinson. Los casos de patología TDP-43 correspondían a 2 casos de ELA y 2 casos de DLFT-ELA.

La edad media al éxitus de los casos con PGA era de 78,7 años (DT 9,6), mientras que la edad media de los casos sin PGA fue de 74,4 ($p < 0,05$). En cuanto a los sexos, entre los casos de PGA había un ligero predominio de mujeres (ratio V/M = 1:1,1), mientras que en los casos sin PGA el predominio, también ligero, era de varones (ratio V/M = 1:0,9) (diferencia no significativa).

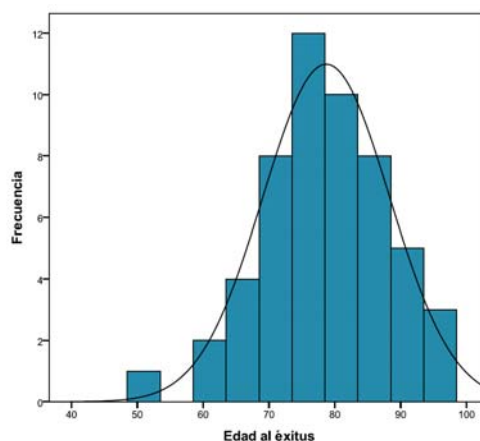


Figura 6. Edad al éxitus de los casos con PGA (normal, prueba de Kolmogorov-Smirnov).

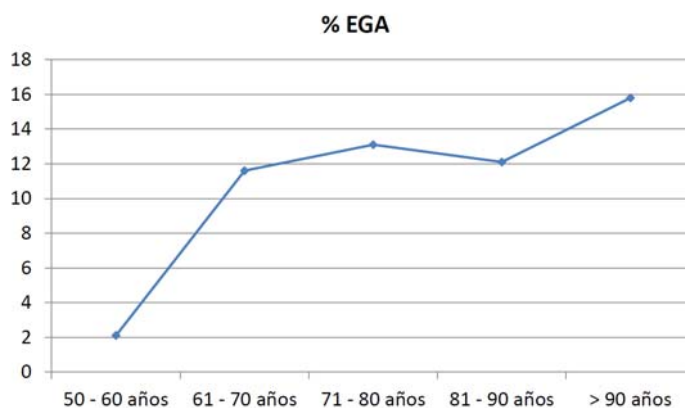


Figura 7. Proporción de casos con PGA para cada grupo de edad de la serie global de referencia.

El valor medio de la edad al inicio de la clínica principal del paciente fue de 71 años (DT 9,1), observándose las evoluciones más prolongadas en los casos con patología de Lewy (12 años, DT 5,7), y las más cortas en la patología TDP-43 (1,8 años, DT 0,3).

Sólo en los casos con patología TDP-43 asociada o AMS no se observó demencia en los pacientes con PGA, mientras que en el resto de las categorías la frecuencia fue variable y alta.

En conjunto, 7 pacientes fueron estudiados post mortem con sospecha clínica de ECJ (3 Vasculares, 2 DCB y 2 Alzheimer), con un tiempo de evolución significativamente más corto que el resto (0,97 frente a 8,39 años, $p < 0,01$).

4.2. HALLAZGOS NEUROPATOLÓGICOS

4.2.1. PERFIL NEUROPATOLÓGICO DE LA PGA

En todos los casos de EGA estudiados se observó la combinación de lesiones características descrita previamente: granos argirófilos, preovillos, inclusiones oligodendrogiales (*coiled bodies*) y astrocitarias (*bush-like astrocytes*), y frecuentes neuronas balonizadas (**Fig. 8**). Estas lesiones se asociaban localmente en la sustancia gris y/o la sustancia blanca de las regiones afectadas. Los GA y los pONF mostraron una distribución claramente más constante, por lo que fueron evaluados específicamente (evaluación semicuantitativas) en distintas áreas, junto a los ONF observados.

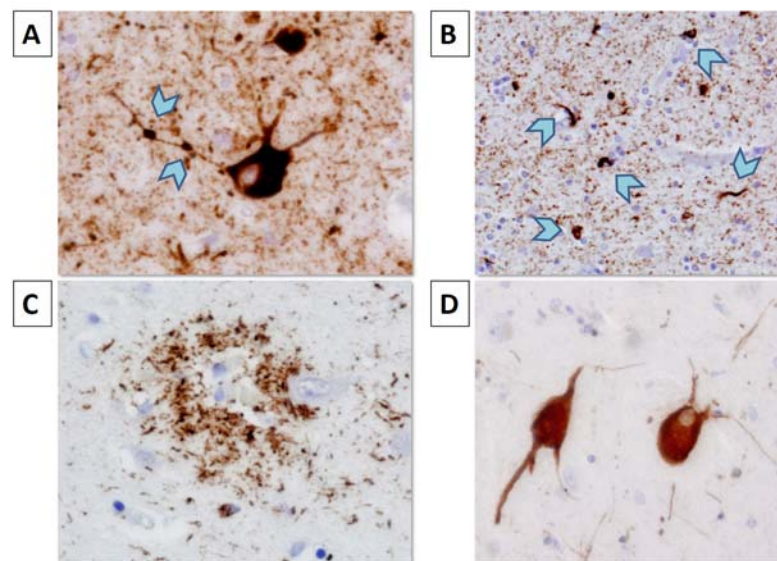


Figura 8. Lesiones histológicas características de la patología de granos argirófilos, inmunotinción para tau AT8 (A,B,C) y α - β -cristalina (C). A. Preovillo con GA de localización dendrítica (flechas). B. Inclusiones oligodendrogiales (*coiled bodies*) (flechas). C. Inclusión astrocitaria (*bush-like*). D. Neuronas balonizadas.

Los GA pudieron identificarse adecuadamente mediante tinción de Gallyas, e inmunotinción para p62 (**Fig. 9**), así como con distintos anticuerpos para tau.

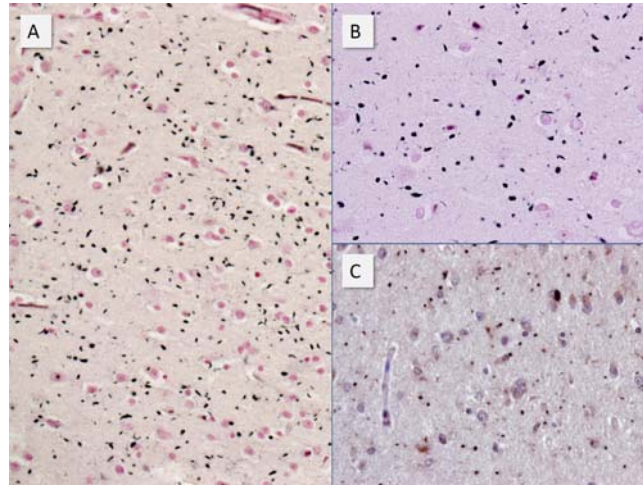


Figura 9. Imágenes de mediano (A) y gran (B,C) aumento de granos argirófilos. Tinción de Gallyas (A,B) e inmunotinción para p62 (C).

Los GA se identificaron con todos los anticuerpos para tau utilizados salvo RD3. Se observó menor tinción de GA (no cuantificada) en la inmunotinción con anti-tau 7.51 y AT180 (**Fig. 10**).

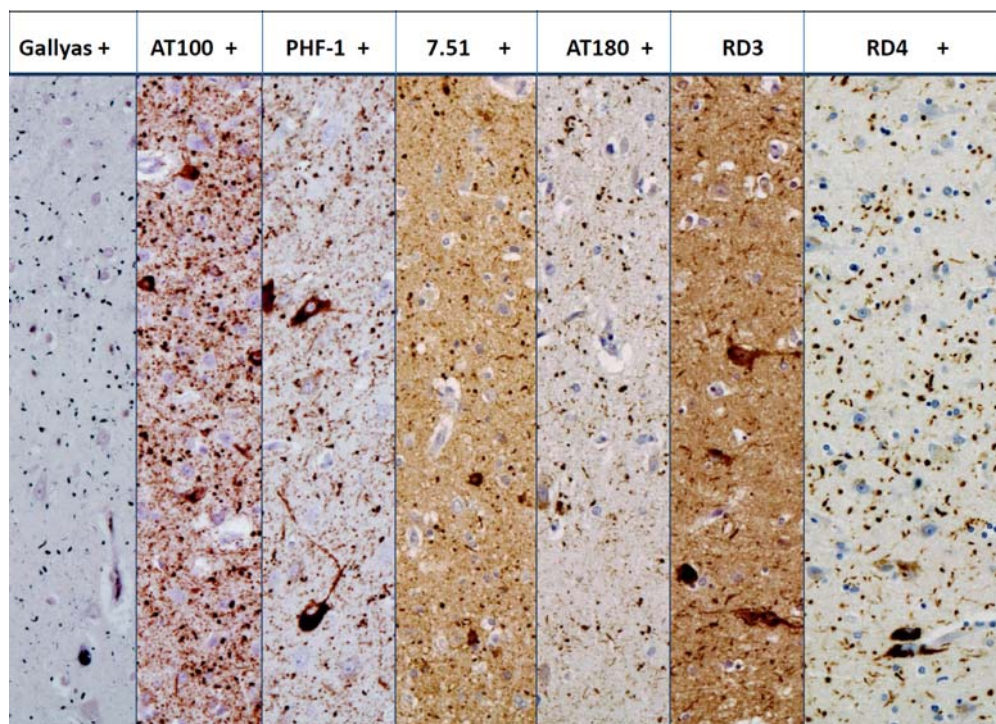


Figura 10. Imágenes de mediano aumento de córtex perirrinal con patología de GA. Todas las técnicas utilizadas, salvo la inmunotinción con anticuerpo para isoformas 3R de tau (RD3) permiten visualizar los GA.

4.2.2. CLASIFICACIÓN NEUROPATOLÓGICA

En la **Tabla 6** se resumen los datos de clasificación neuropatológica de la serie, agrupados por grupos de patología asociada. A diferencia de la **Tabla 4**, los casos se han agrupado, no por diagnóstico neuropatológico principal específico, sino por grupo molecular de diagnóstico, incluyendo un grupo heterogéneo que contiene la patología TDP y los casos individuales de AMS y E. de Huntington. Para algunos análisis será necesario extraer de este grupo los casos de patología TDP, que presentan rasgos específicos, con respecto a las variables de demencia, EH y patología TDP, entre otras.

Tabla 6 Datos de clasificación neuropatológica, distribución por grupos de patología asociada.

Patología 1ª asociada	Taupatías	Alzheimer	Lewy	Otras ND ^a	Vascular	Total
N	20	12	4	6	10	53
Peso (g) ^b	1040	1031	1255	1126	1047	1063
Placas (0-3) ^c	0,52	2,5	0,75	0,01	0,8	1 (± 1,18)
Braak τ (0-6) ^c	2,2	4,83	2,5	1,33	2,44	2,9 (± 1,64)
Tau LTM (0-5) ^c	2	4,44	1,67	0,83	2,14	2,62 (± 1,57)
A- β hip. (0-4) ^c	0,4	3,63	2	1,5	3	2 (± 1,67)
NIA (0-3) ^c	0,45	2,58	0,5	0	0,7	0,94 (± 1,16)
α -sin. (0-6) ^c	0,42	1,42	6	0	1,1	1,18 (± 2,16)
AA (0-3) ^c	0,11	1,17	1	0	0,5	0,48 (± 0,85)
Pat vasc (0-9) ^c	1,82	3,36	2	0	4,4	2,57 (± 1,78)
Mxvasc. (0-3) ^c	1,18	2,25	1	0,5	2,7	1,66 (± 1,01)
Escler. hip. (%)	14,3	25	0	30	10	17
TDP-43 (%)	8,3	75	0	66,6	14,3	28,6

(^a): Se incluyen en este grupo los casos de patología TDP, AMS y Huntington de la serie. (^b): \bar{x} . (^c): Se incluye la media para cada grupo, y $\bar{x} \pm DT$ para la serie total.

Los datos del peso encefálico global indican la existencia de atrofia moderada a severa en todos los grupos, salvo en el de patología de Lewy. En cuanto a la patología de tipo Alzheimer (frecuencia de placas según criterios CERAD, estadio de Braak para patología tau, microestadiaje de tau en el LTM (Lace *et al.*, 2009, estadiaje de patología A β total en el LTM, presencia e intensidad de angiopatía amiloide, y valoración global de acuerdo con los criterios NIA 2012), todas las variables muestran fuerte correlación entre ellas, con altos coeficientes de correlación (rho de Spearman) (**Tabla 7**).

Tabla 7. Correlación bivariada entre variables indicativas de patología de tipo Alzheimer en la serie de casos con PGA.

	Placas N				
Placas N		Braak τ			
Braak τ	Sig. (CC=0,81)		Tau LTM		
Tau LTM	Sig. (CC=0,75)	Sig. (CC=0,9)		A β hipoc.	
A β hipoc.	Sig. (CC=0,86)	Sig. (CC=0,76)	Sig. (CC=0,83)		AA
AA	Sig. (CC=0,57)	Sig. (CC=0,59)	Sig. (CC=0,6)	Sig. (CC=0,67)	
Clasif NIA	Sig. (CC=0,97)	Sig. (CC=0,88)	Sig. (CC=0,8)	Sig. (CC=0,83)	Sig. (CC=0,58)

En cuanto a los datos de patología vascular, se observa igualmente fuerte correlación entre el índice vascular total y el índice de patología de pequeño vaso (CC = 0,9, $p < 0,01$). Ambas variables muestran valores máximos en el grupo Vascular, si bien son igualmente elevados, en menor medida, en el grupo de Alzheimer. Ambas variables vasculares, al igual que todas las variables asociadas a patología de Alzheimer, muestran correlación significativa con la edad al óbito.

La esclerosis del hipocampo y la presencia de inclusiones TDP-43 (+) en el hipocampo muestran asociación significativa (Mantel-Haenszel, $p < 0,01$), y ambas características son más frecuentes en el grupo de Alzheimer y en el de patología TDP.

4.2.3. PATOLOGÍA COMBINADA

Patología de tipo Alzheimer. En la serie de casos de referencia, dentro del grupo con diagnóstico neuropatológico principal de EA, los casos con PGA mostraron una edad media al óbito significativamente superior a los casos sin PGA (86 frente a 78,9 años, $p < 0,05$) (**Fig. 11**). En ambos grupos se observó un predominio (V/M) de mujeres, más acusado en los casos con PGA (1:2,25 frente a 1:1,2).

Patología de tipo Lewy. En el grupo con patología de tipo Lewy, los casos con PGA mostraron una edad media mayor que los casos sin PGA (82,25 frente a 75,9 años), si bien la diferencia no era es-

tadísticamente significativa. Todos los casos con PGA eran varones, mientras que en los casos sin PGA el predominio de varones era 1,3:1.

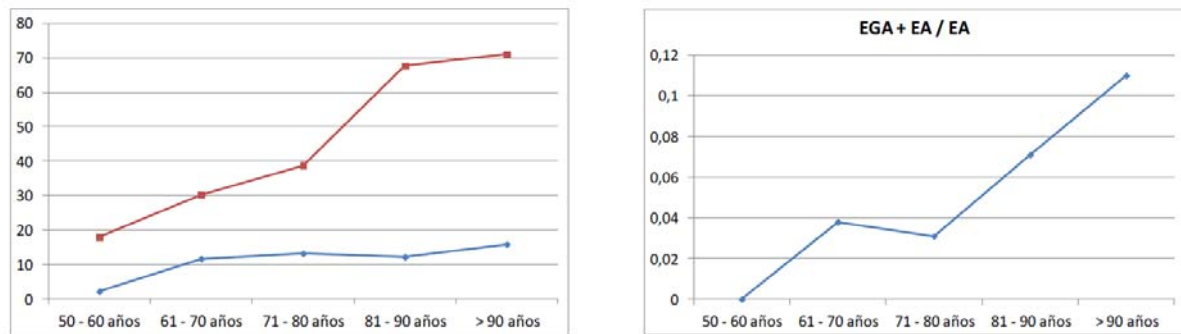


Figura 11. Izquierda: comparación entre la distribución, por grupos de edad, del porcentaje de casos de EA (línea roja) y PGA (línea azul) en relación con la serie global de referencia. Derecha: ratio de EGA + EA sobre el total de casos de EA para cada grupo de edad.

Taupatías. Tomados en conjunto, los casos de taupatía con y sin PGA mostraron una edad media al exitus similar (74,2 frente a 74,7), sin diferencia significativa. Se observó predominio de varones en los dos grupos, igualmente sin diferencia significativa (2:1 y 1,8:1). Entre el grupo de PSP, los casos con PGA mostraron una edad media inferior al resto (72,6 frente a 75,1), si bien la diferencia no era significativa. En el grupo de DCB, los casos con PGA mostraron una edad media superior (77,5 frente a 74,4 años) ($p > 0,05$).

Patología TDP. En la serie de origen los casos PGA (+) y PGA (-) muestran una notable diferencia de edad media (70,3 y 62,7 años, respectivamente, si bien no significativa). En cuanto al ratio de sexos, de nuevo con una n reducida, se observa predominio de mujeres en casos PGA (+) (1/3), y de varones en PGA (-) (34/26), diferencia no significativa.

Patología vascular cerebral. El análisis de la serie de casos de referencia no ofreció diferencias significativas en cuanto a la edad de los casos de patología vascular cerebral con y sin PGA (84,2 frente a 83,3 años). Se observó un predominio de mujeres en los casos PGA (+) (4/8), y de varones en los PGA (-) (14/7), diferencia significativa ($p < 0,05$), si bien con una n muy reducida.

Esclerosis del hipocampo. El 17 % de los casos PGA (+) presentan EH, frente al 9,9 % de los casos PGA (-), diferencia no significativa. En conjunto, en la serie de referencia, los casos con EH presentan una edad al éxitus significativamente mayor que los EH (-) (79,1 frente a 74,1 años, $p < 0,01$).

4.2.4. DISTRIBUCIÓN DE LA PATOLOGÍA Y ESTADIOS

La patología de GA, y fundamentalmente los GA y los pONF, mostraron en todos los casos un patrón de distribución altamente homogéneo, con fuerte correlación entre las variables registradas y entre los distintos niveles coronales de estudio (ver **Tabla 5, Material Suplementario**). Se observa extensa correlación positiva entre las variables características de PGA, y algunos casos de correlación negativa en los que intervienen variables de ONF, especialmente en los segmentos anteriores. La **Fig. 12** representa el perfil lesional correspondiente a los GA y pONF, definido por los valores medios de las variables correspondientes. De izquierda a derecha, el perfil, en ambos casos, está definido por 3 picos (la amígdala en el nivel 1 y CA1 en los niveles 2 y 3), desde los que parten líneas descendentes hasta niveles mínimos (subículum en el nivel 2 y 3, y el giro dentado en el nivel 3). Se observa, asimismo, que los valores medios, tanto en los picos como en los valles y en las líneas descendentes intermedias, disminuyen de izquierda a derecha, esto es, en el eje anatómico ántero-posterior.

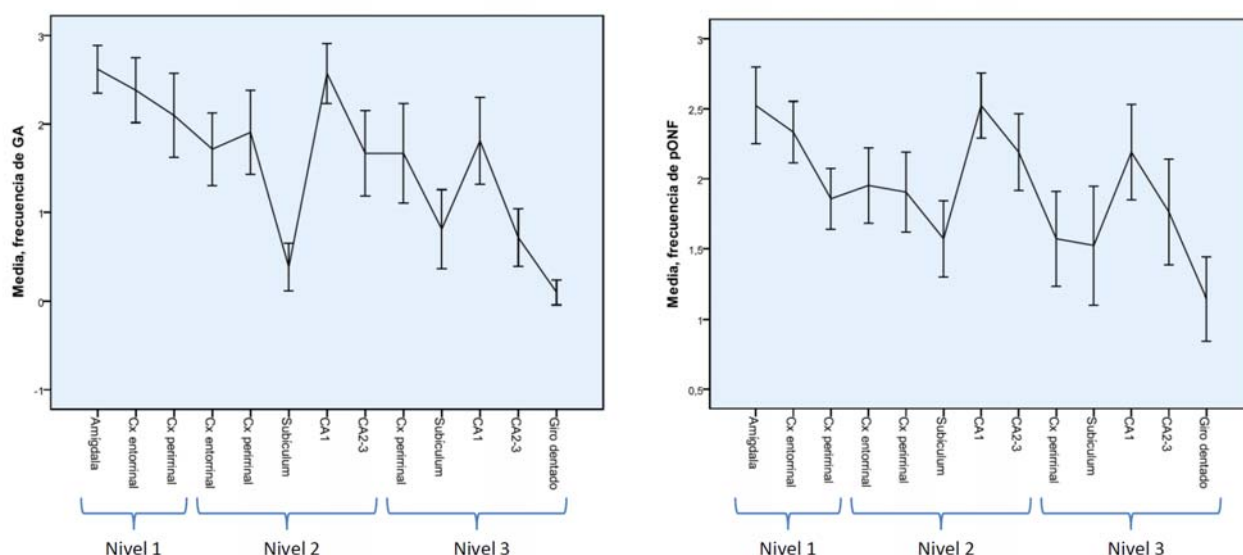


Figura 12. Perfil lesional (media \pm intervalo de confianza del 95%) de la serie de casos con PGA para GA (izquierda) y pONF (derecha). Se representan sucesivamente las áreas evaluadas en los tres niveles coronales.

Los gráficos anteriores revelan un patrón común de distribución de la patología, con variabilidad en la intensidad y extensión de las lesiones en cada área, acorde con la progresión de la patología en estadios sucesivos regulares. A continuación se describe esta distribución de las lesiones características para cada uno de los niveles de estudio, y en los distintos grados de extensión de la patología.

Nivel 1: En todos los casos se observan abundantes GA y pONF en los nn. basolaterales de la amígdala, y especialmente en el núcleo basolateral ventromedial (BLVM), y en el córtex suprayacente, en estrecha relación con el *gyrus ambiens*. A ese nivel los núcleos de la amígdala pueden contener placas

neuríticas y ONF con intensidad variable con la carga de patología de tipo Alzheimer. Algunas placas neuríticas incluyen GA. En casos con mayor extensión de la patología se observa intensidad alta de GA y pONF a lo largo de todos los nn. basolaterales y eventualmente todos los núcleos de la amígdala. En todos los casos se observan frecuentes NB, incluso en áreas alejadas de los GA. En cuanto al córtex, se observa un gradiente de afectación en sentido medio-lateral que afecta al CxE y al CxP. En estas áreas corticales los GA se encuentran densamente localizados en la capas II y con menor densidad en las capas III y V. En dichas capas se observan pONF, mientras que en las capas inferiores se identifican NB.

Niveles 2 y 3: Son constantes la afectación de CxE, CxP y CA1, con gradientes de afectación que se mantienen en estadios sucesivos. En el córtex la intensidad de afectación es máxima en el CxT, con gradientes decrecientes en ambos sentidos laterales, esto es, hacia el CxE y hacia el CxP. En estas áreas, al igual que en el nivel más anterior, la patología es más intensa en capas II y III, con máxima densidad de GA en capa II, y afectación progresiva por pONF de capas III, II y V. Se mantiene el gradiente medio-lateral descrito en CxP en el Nivel 1, que puede seguirse aquí en algunos casos hasta el límite topográfico de afectación. En el córtex del hipocampo, la afectación por GA y pONF es máxima en todos los casos en el límite de CA1 con el subículum, con un gradiente decreciente hacia CA2. En CA3 suele observarse un foco de pONF que en ocasiones se asocia a un grado variable de GA. El subículum y el giro dentado sólo presentan afectación relevante en estadios avanzados, y en la serie sólo se observaron GA en la capa molecular del GD en un caso en estadio 3. En el nivel 3, suele observarse una disminución de la intensidad de la patología en áreas homólogas a las del nivel 2, y una posición del límite lateral de la patología equivalente a la del nivel anterior (con disminución relativa de la intensidad).

Estos hallazgos son concordantes, en conjunto, con el sistema de estadiaje utilizado por Thal *et al.* (2005), y que aparece ejemplificado en la **Fig. 13** en cortes representativos del nivel 2 de evaluación, con inmunotinción para AT8. En estadios sucesivos puede observarse un aumento global de la tinción en CxE y CA1 (especialmente entre los estadios 1 y 2), que se va extendiendo hacia el CxP (especialmente entre los estadios 2 y 3).

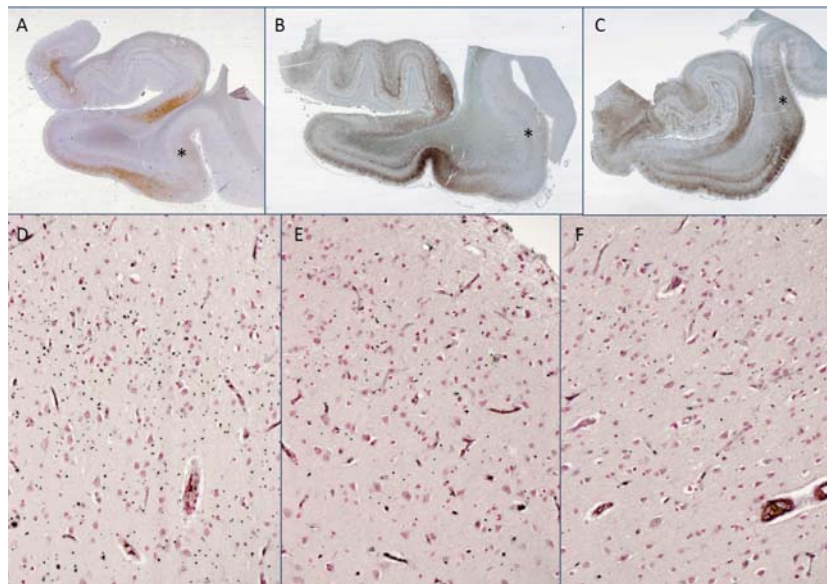


Figura 13. A-C. Imágenes macro-microscópicas de secciones del nivel 2 de evaluación de tres casos distintos con PGA, con inmunotinción para AT8, representativas del estadio 1 (A), 2 (B), y 3 (C) de PGA. (*) Córtex perirrinal. D-F. Tinciones de Gallyas de córtex transentorrinal (D), perirrinal (E) y temporal inferior (F). Nótese la densidad decreciente de GA al avanzar en el eje medio-lateral.

De forma convencional, se ha adoptado este sistema de estadiaje para clasificar los casos, a pesar de que los cambios observados son continuos. No se ha observado correlación significativa de los estadios con la edad al éxitus, la de edad de inicio o el tiempo de evolución de la clínica. El grupo de casos de taupatía y de Alzheimer mostró una mayor proporción de casos en estadio 3 que el resto de grupos, y se observó un predominio de casos en estadio 2 en el grupo vascular (**Fig. 14**).

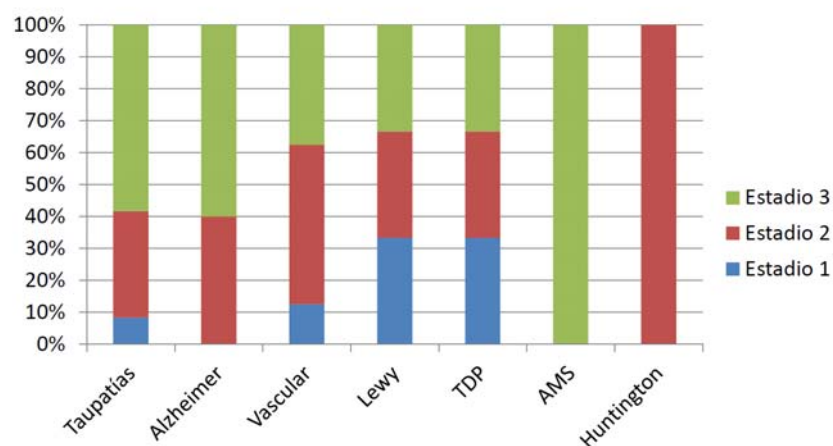


Figura 14. Distribución de casos con diferentes estadios de APG por patología (diagnóstico neuropatológico principal).

A continuación el estudio se limitó al grupo de casos con estadio de Braak \leq II ($n = 23$), con el fin de evitar posibles interferencias de la patología de EA en la evaluación de la patología de GA. La **Fig. 15**

muestra el incremento progresivo de la gran mayoría de las variables de GA y pONF en todas las áreas evaluadas en estadios sucesivos de AGP.

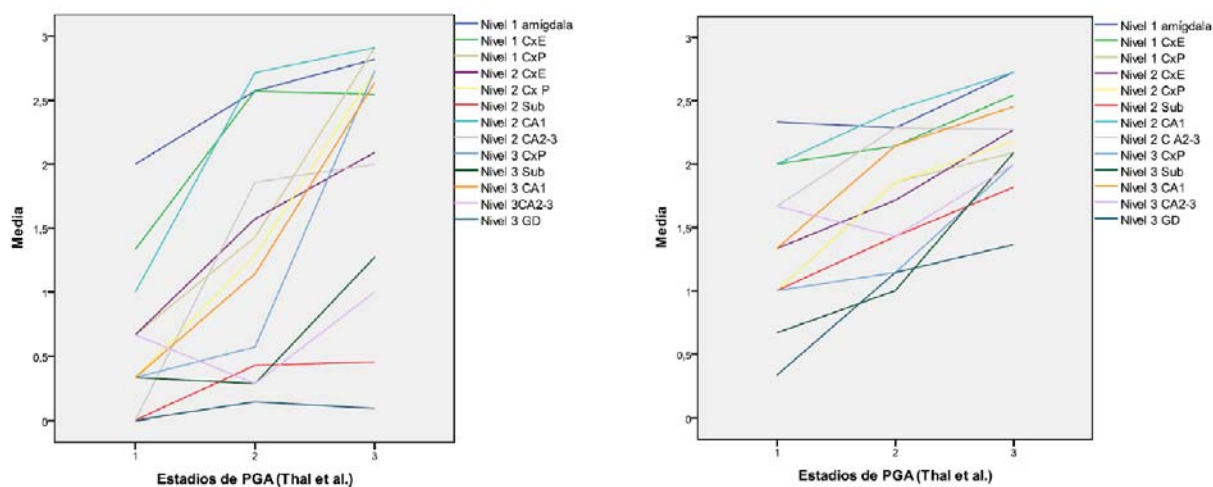


Figura 15. Diferencias entre las medias de las distintas variables morfológicas de GA (izquierda) y pONF (derecha), estratificadas por estadio de AGP.

Para algunas de las variables, el incremento con el estadio de AGP es particularmente evidente, como muestra la **Fig. 16**.

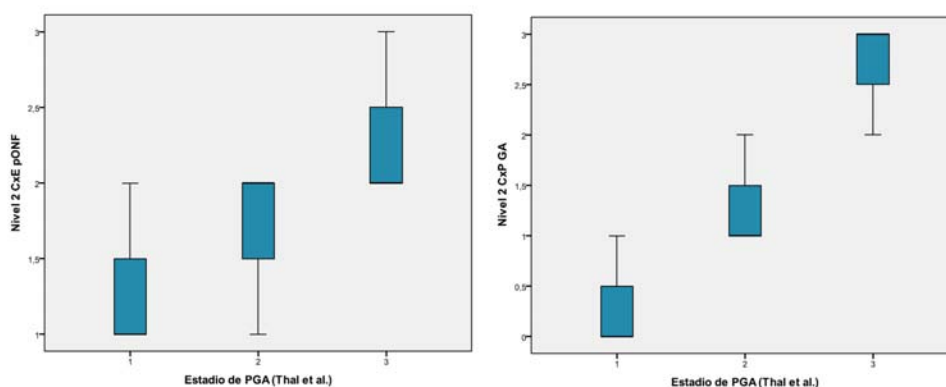


Figura 16. Gráfico de cajas correspondiente a los valores de pONF en corteza entorrinal en hipocampo anterior (izquierda), y de GA en corteza perirrinal en el mismo nivel antero-posterior. Los casos están estratificados por estadio de AGP.

Como muestran las figuras anteriores, el CxP, en los 3 niveles coronales, revela especialmente bien la progresión de la patología en los sucesivos estadios. Por ello, se seleccionaron los casos sin patología de Alzheimer relevante (NIA = 0), y se ordenaron de mayor a menor afectación teniendo en cuenta la frecuencia de GA en CxP de los niveles 1, 2 y 3. El resultado, que puede observarse en la **Fig. 17** (izquierda) es una regular gradación de la intensidad de la patología, de mayor a menor intensidad de afectación en la serie de casos, y de niveles anteriores a niveles posteriores.

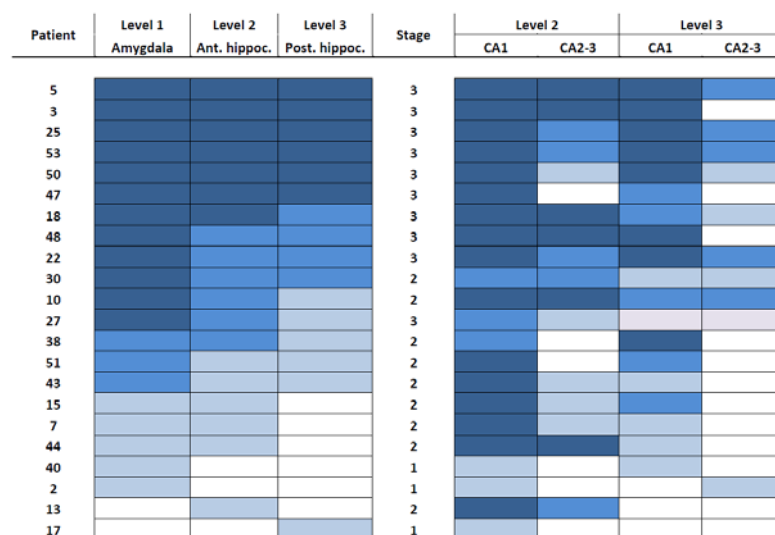


Figura 17. Representación esquemática de la intensidad de patología GA (frecuencia de GA) en el córtex peririnal de los niveles 1-3 (izquierda) y ordenación de los casos de mayor a menor. El gráfico de la derecha representa la distribución de la misma patología en el córtex del hipocampo (niveles 1 y 2) siguiendo el orden de casos establecido en el esquema anterior.

Los casos así ordenados siguen igualmente una ordenación correlativa con respecto al sistema de estadiaje empleado. Si se incluyen las variables de frecuencia de GA en CA1 y CA2-3 (niveles 2 y 3), en la serie ordenada de acuerdo con la afectación del CxP (**Fig. 17**, derecha), se obtiene un gradiente decreciente menos regular, pero evidente, no sólo en sentido ántero-posterior, sino además en sentido CA1 → CA2-3.

En cuanto a la distribución de ONF, las áreas de máxima frecuencia coinciden con las de GA y pONF, con incremento global de los valores y una mayor frecuencia relativa de ONF en CA2-3 en el grupo de Braak medio-alto (**Fig. 18**).

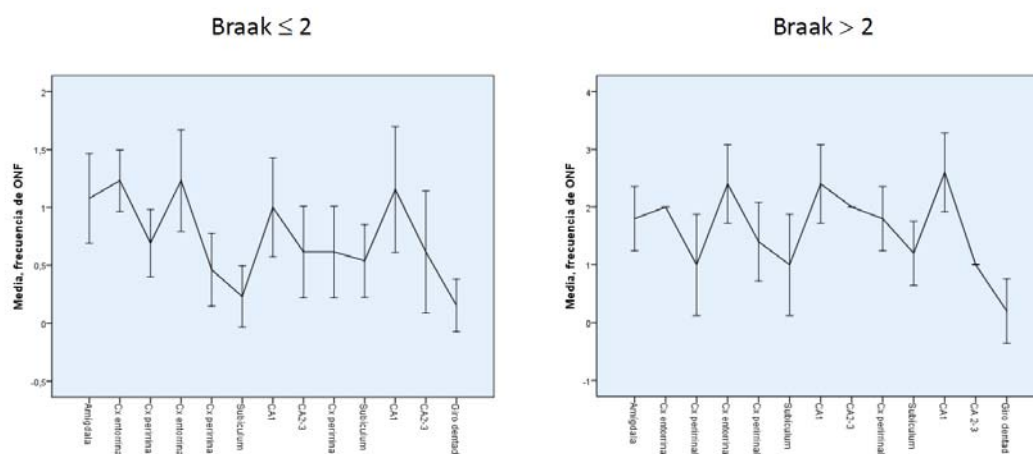


Figura 18. Perfil lesional de la frecuencia de ONF en los grupos de estadio de Braak bajo (izquierda) y medio-alto (derecha). Nótese las diferentes escalas de ambos gráficos.

4.3. ANÁLISIS DE ISOFORMAS DE TAU

El análisis de los extractos obtenidos a partir de los pacientes con PGA, realizado mediante electroforesis/Western blot, se identificó en todos ellos una banda predominante con una movilidad electroforética relativa correspondiente a una proteína de 64 K (**Fig. 19C**). Esta banda podría resultar de la suma de las dos isoformas de tau que contienen el exón 2, sólo una de las cuales contiene además el exón 10 (**Fig. 19B**). Se realizó Western blot para comprobar la presencia o ausencia de exón 10 mediante anticuerpos específicos que reconocen las isoformas de tau 3R o 4R. En la banda de 64 K obtenida a partir de los casos con PGA sólo se observó reactividad para isoformas 4R. También se observó reactividad de esta banda frente a un anticuerpo frente a la secuencia entre los aminoácidos 55 y 67 de tau (nomenclatura de la isoforma de tau más larga presente en el SNC adulto), correspondiente al exón 2. Concluimos, pues, que la principal isoforma de tau presente en los agregados de la PGA es la que contiene los exones 2 y 10, y no contiene el exón 3 (**Fig. 19D**).

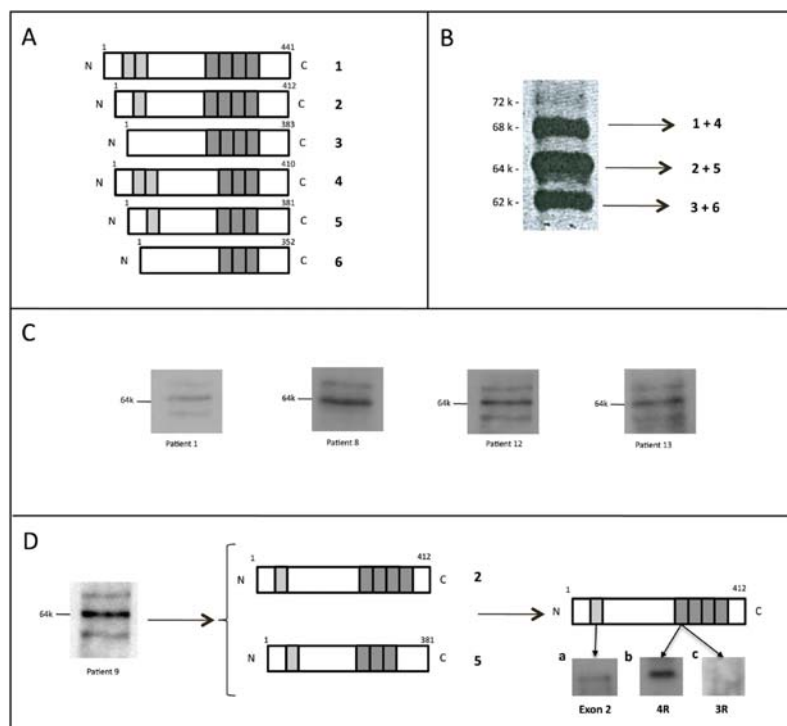


Figura 19. A. esquema de las 6 isoformas de tau expresadas en el SNC humano. B. Proteína tau fosforilada presente en los agregados de tau de pacientes con E. de Alzheimer, y su correspondencia con las diferentes isoformas de fosfo.tau. C. Isoformas de fosfo-tau (detectadas mediante Western blot utilizando el anticuerpo 7.51) presentes en los agregados de tau aislados en los pacientes: 1 (EGA pura), 8 (EGA + PSP), y 13 (EGA + EH). En todos los casos se observa la presencia de una proteína principal con una movilidad electroforética de 6kDa. D. Isoformas de fosfo-tau presentes en los agregados de tau del paciente 9 (EGA + EP). Se observa igualmente una proteína principal a 64 kDa con el anticuerpo 7.51 (se observó una imagen similar con AT100). Esta banda puede corresponder a una mezcla de dos isoformas de tau (isoformas 2 y 5, Fig. 19B. Puesto que la proteína de 64 kDa no muestra reactividad para isoformas 3R, se propone que la isoforma de tau predominante corresponde a la que contiene los exones 2 y 10 (4R), y no incluye el exón 3.

En las muestras de CxE y córtex del hipocampo obtenidas de 8 cerebros con estadio de Braak \leq II se obtuvo un perfil de bandas homogéneo, aunque con ciertas diferencias de intensidad entre algunos casos (tau 7.51). Mediante el anticuerpo 4R se detectaron dos bandas intensas, una de las cuales, a 64K, se marcaba de nuevo con el anticuerpo para exón 2. En algunas de las muestras se demostró además que esta banda era el banda predominante de tau fosforilada (PHF-1). Así, pues, el patrón descrito previamente (**Rábano *et al.*, 2013, Material Suplementario**) se reproduce en una serie de nuevos casos con estadio de Braak bajo (**Fig. 20**).

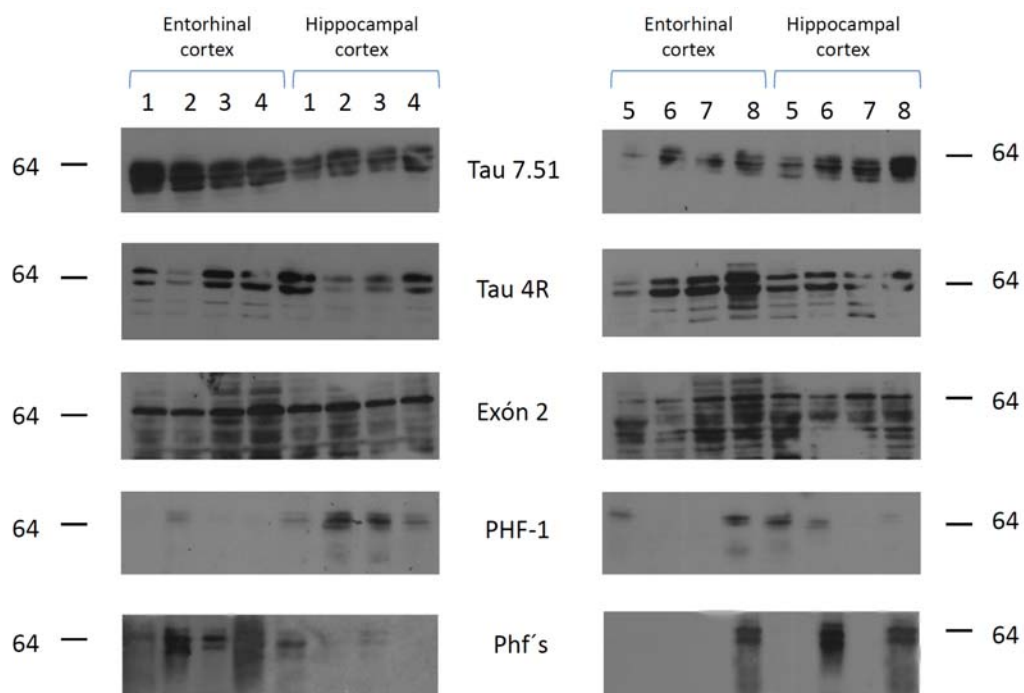


Figura 20. Western blots para distintos anticuerpos anti-tau de muestras de córtex entorrinal y córtex del hipocampo procedentes de 8 pacientes con estadio de Braak \leq II. Nótese la banda predominante de 64k, en CxE y córtex del hipocampo, tanto en casos asociados a taupatía 4R como en casos sin otra taupatía asociada. P1: PGA + PSP; P2: PGA + Vascular; P3: PGA + PSP; P4: PGA + AMS; P5: PGA + PSP; P6: PGA + Parkinson; P7: PGA + DCB; P8: PGA + DCB. El panel de la izquierda (Pacientes 1-4) y el de la derecha (Pacientes 5-6) proceden de dos bio-bancos distintos.

4.4. AISLAMIENTO DE FIBRAS E INMUNOMICROSCOPÍA ELECTRÓNICA

A partir de las muestras de tejido cerebral de pacientes con PGA se obtuvieron agregados filamentosos con características estructurales de PHF, así como ocasionales filamentos rectos. La cantidad de filamentos observados fue en todos los casos notablemente inferior a la obtenida en casos con patología de tipo Alzheimer en estadios avanzados (**Fig. 21**).

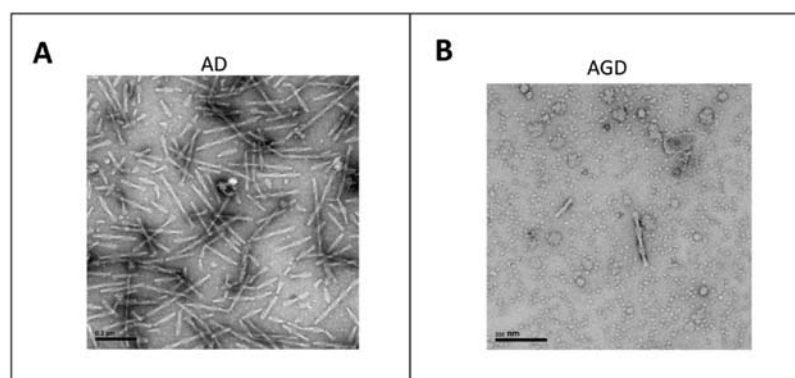


Figura 21. Polímeros fibrilares obtenidos a partir de un extracto celular del lóbulo temporal de **(A)** un paciente con E. de Alzheimer y **(B)** de un paciente con PGA (escala = 200 nm).

Los análisis de inmunomicroscopía electrónica, realizados con los anticuerpos AT8 y PHF-1, indican la presencia de fosfo-tau en los filamentos (**Fig. 22**).

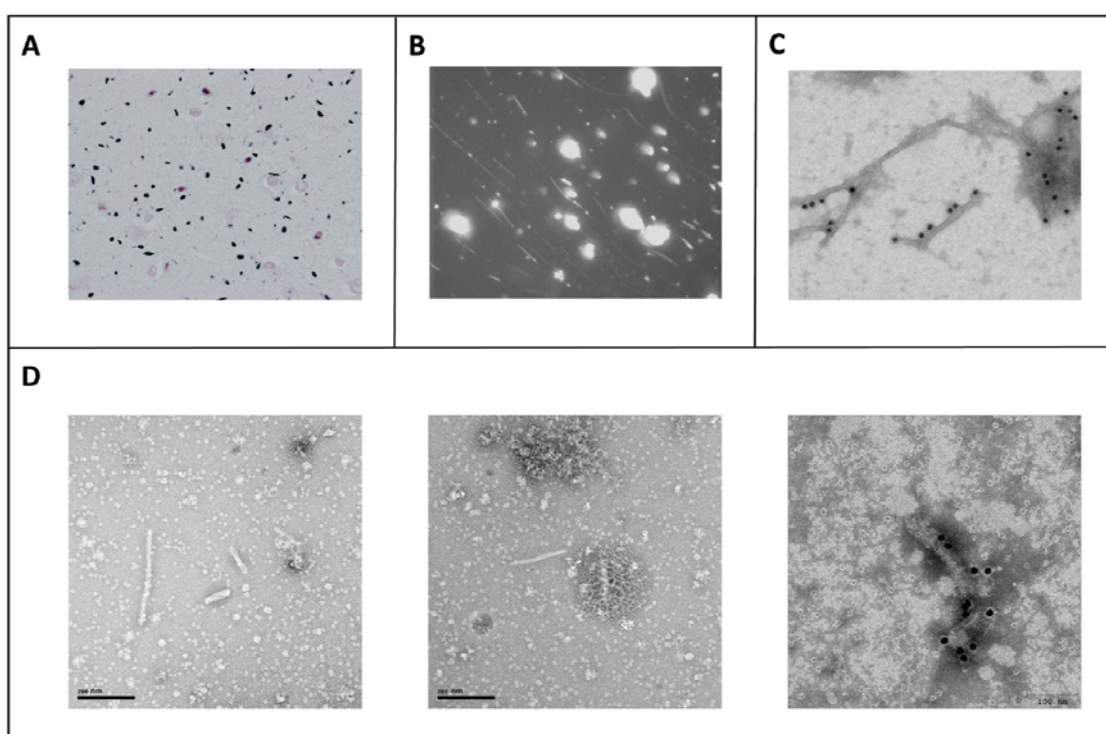


Figura 22. Agregados de GA. **A.** Imagen de gran aumento del sector CA1 del córtex del hipocampo del paciente 1, tinción de Gallyas. **B.** Tinción de inmunofluorescencia que muestra la reactividad de los agregados de PGA con el anticuerpo AT8. **C.** Inmunomicroscopía electrónica de agregados de PGA que reaccionan con el anticuerpo AT8 y un anticuerpo secundario ligado a partículas de oro. **D.** Polímeros fibrilares (izquierda y centro) obtenidos a partir de tejido de PGA (extractos del lóbulo temporal) y tras su reacción con el anticuerpo PHF-1 (derecha).

Estos hallazgos se han reproducido en las muestras obtenidas en la segunda fase del estudio, basada en tomas selectivas de córtex entorrinal y córtex del hipocampo.

4.5. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS MEDIANTE INYECCIÓN INTRANEURONAL

En total, se inyectaron 704 neuronas con Lucifer Yellow en distintas regiones corticales de 5 casos. Las neuronas inyectadas fueron teñidas posteriormente con PHF-tau_{AT8} o PHF-tau_{PHF-1}. Sin embargo, sólo en 3 pacientes (P9, P13 y P14) se obtuvo un número suficiente de neuronas marcadas con PHF-tau_{AT8} para realizar el estudio cuantitativo. Para el análisis morfométrico de las dendritas basales se seleccionaron neuronas piramidales de la capa III de córtex parahipocampal (P9), y de CA1 (P9, P13, P14).

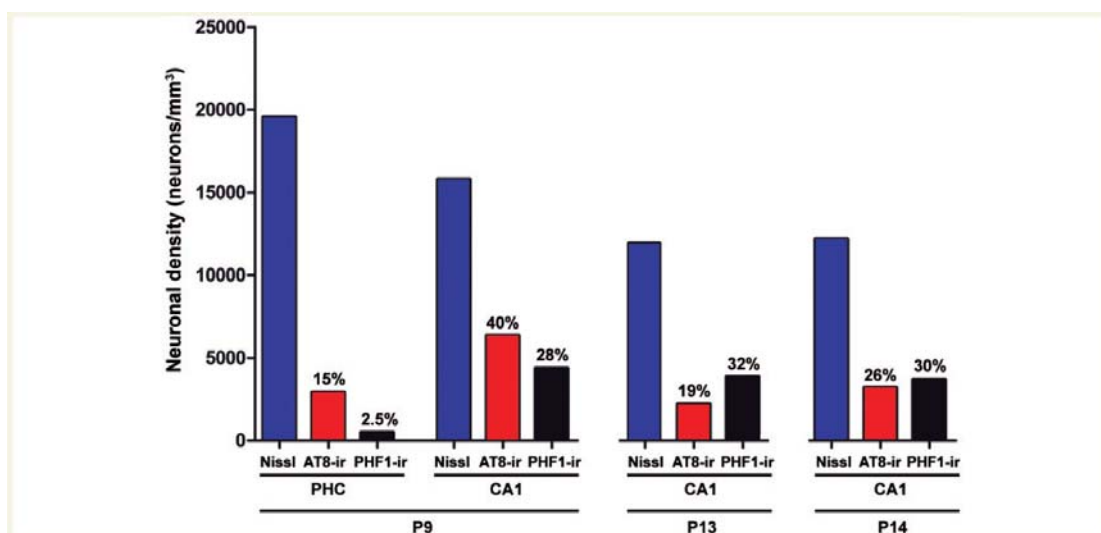


Figura 23. Densidad neuronal. Gráfico que muestra la densidad neuronal en el córtex parahipocampal y en la región CA1 de los Pacientes P9, P13 y P14. Columnas azules: densidad neuronal total; columnas rojas: densidad de neuronas inmunorreactivas para PHF-tau_{AT8}; columnas negras: densidad de neuronas inmunorreactivas para PHF-tau_{PHF-1}. Los porcentajes que figuran sobre las columnas rojas y negras representan el porcentaje de neuronas reactivas para fosfo-tau con respecto a la densidad neuronal total en cada región.

Mediante recuento estereológico se cuantificó la densidad total de neuronas y la densidad de neuronas inmunorreactivas para PHF-tau_{AT8} o PHF-tau_{PHF-1} en las áreas indicadas (**Fig. 23**).

Las neuronas inmunorreactivas para PHF-tau_{AT8} fueron clasificadas de acuerdo con un patrón previamente establecido (Blazquez-Llorca *et al.*, 2010). Las neuronas con el patrón I muestran inmunotinción citoplásmica difusa, aunque pueden presentar pequeños agregados fibrilares detectables mediante tioflavina-S (posibles pONF). Las neuronas con el patrón II forman ONF típicos. En el presente estudio, se subdividió el patrón II en los patrones IIa y IIb, dependiendo del grado de desarrollo de los ONF, evaluado mediante PHF-tau_{AT8}, PHF-tau_{PHF-1} y tioflavina-S (patrón IIa, intermedio/avanzado, patrón IIb, estadio extremo).

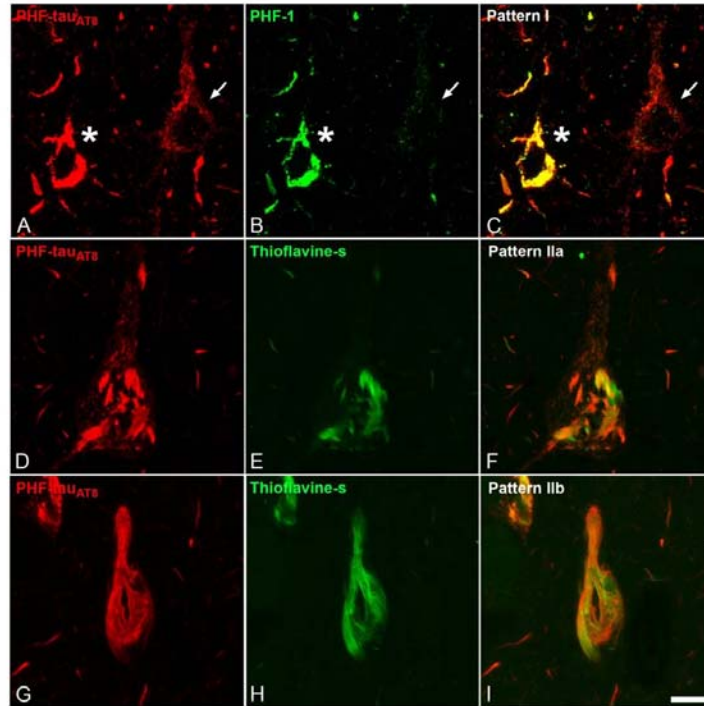


Figura 24. Patrones de inmunotinción con PHF-tau. **(A-C)** Imágenes de microscopía confocal de cortes con doble tinción para PHF-tau_{AT8} (rojo) y PHF-tau_{PHF-1} (verde), que muestran una neurona con doble tinción y el patrón IIb de inmunotinción (asteriscos). **(D-I)** Imágenes de microscopía confocal que muestran neuronas de CA1 con doble tinción para PHF-tau_{AT8} (rojo) y tioflavina-S (verde), con los patrones IIa (D-F) y IIb (G-I) de inmunotinción. Escala (en I): 15 μ m en A-C, 10 μ m en D-I.

Mediante reprocesamiento de los cortes se determinó el grado de colocación neuronal de PHF-tau_{AT8} y PHF-tau_{PHF-1}. Mientras que todas las neuronas reactivas para PHF-tau_{AT8} también lo eran para PHF-tau_{PHF-1}, algunas neuronas reactivas para PHF-tau_{PHF-1} eran negativas para PHF-tau_{AT8}. Sin embargo, para los estudios cuantitativos, se clasificaron las neuronas como PHF-tau⁺ y PHF-tau⁻, cuando eran inmunorreactivas para ambos anticuerpos o para ninguno de ellos, respectivamente.

El análisis cuantitativo tridimensional incluyó un total de 42 neuronas inyectadas con Lucifer Yellow, y 19569 espinas dendríticas (10334 espinas de neuronas PHF-tau⁻, y 9235 espinas de neuronas PHF-tau⁺ que no se encontraban en contacto con placas de β -amiloide). Todas las neuronas parahipocámpales PHF-tau⁺ del P9 analizadas mostraban un patrón I, mientras que las neuronas PHF-tau⁺ analizadas en CA1 en los 3 pacientes presentaron un patrón IIa. Inicialmente, las características microanatómicas de las dendritas de las neuronas PHF-tau⁻ eran similares a las de las neuronas positivas con patrón I o IIa, mientras que las neuronas con patrón IIb presentaban un árbol dendrítico reducido con disminución del diámetro dendrítico y presencia de pocas o ninguna espina dendrítica.

En las dendritas basales de células piramidales PHF-tau⁺ y PHF-tau⁻ correspondientes a las localizaciones y pacientes descritos, se realizó un estudio cuantitativo que incluyó diámetro dendrítico, densidad de espinas dendríticas, y longitud y volumen de las espinas. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados entre las neuronas negativas y las neuronas con patrón I. En cuanto a las neuronas con patrón IIa, sólo el P9 mostró una reducción significativa del diámetro dendrítico, mientras que en los pacientes P13 y P14 se observó una reducción de la densidad dendrítica en las porciones media y distal. En cuanto a la longitud de las espinas, de nuevo sólo P9 mostró una reducción significativa de la longitud media, mientras que los pacientes P9 y P13 mostraron una mayor frecuencia de espinas cortas, y P14 una frecuencia menor que en las neuronas PHF-tau⁺. La mayoría de las dendritas de neuronas con patrón IIa presentaban depósito fibrilar de tau en su segmento distal. El análisis de parámetros cuantitativos de las espinas a este nivel en P9 reveló una menor densidad de espinas en comparación con segmentos proximales.

4.6. EXPRESIÓN GÉNICA EN EL CÓRTEX ENTORRINAL

La comparación entre la expresión génica de las capas superiores e inferiores del CxE dio como resultado una mayor expresión de la proteína Gla de la matriz (MGP), transgelina, colágeno tipo 1 α 2 (COL1A2) y reelina en las capas superiores.

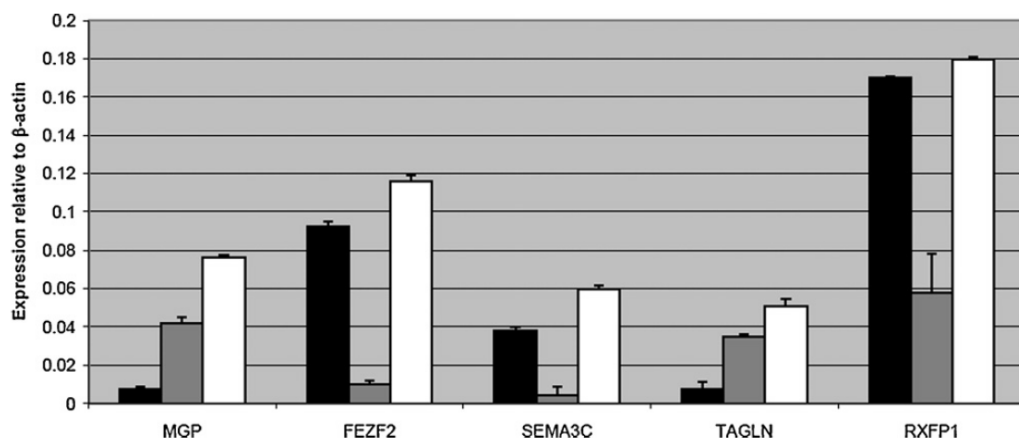


Figura 25. Análisis de RT-PCR de genes candidatos sobre o infrarregulados en distintas capas del CxE. Se analizó mediante RT-PCR una selección de los genes candidatos procedentes del análisis de microarrays. La expresión se cuantificó como la cantidad relativa (delta delta Ct) con referencia al gen de beta-actina. El análisis de RT-PCR se realizó en muestras correspondientes a CxE inferior (LEC), CxE superior (UEC), y CxE total (TEC).

En las capas inferiores se observó una mayor expresión de semaforina 3C (dominio) (SEMA3C), péptido 2 de la familia de *zinc finger* FEZ (FEZF2), y del receptor 1 del péptido de la familia *insulin-like* relaxina (RXFP1). Para validar los datos obtenidos con *microarrays*, se realizó análisis de PCR en tiempo

real en 5 transcritos seleccionados, y los perfiles de expresión de todos los genes testados confirmaron los resultados de *microarrays*. Asimismo, los niveles de proteína de MGP, reelina y SEMA 3C fueron evaluados por Western blot utilizando muestras de 7 individuos distintos (de edades comprendidas entre 50 y 72 años), y se detectó una mayor cantidad de proteína en los niveles superiores que en los inferiores.

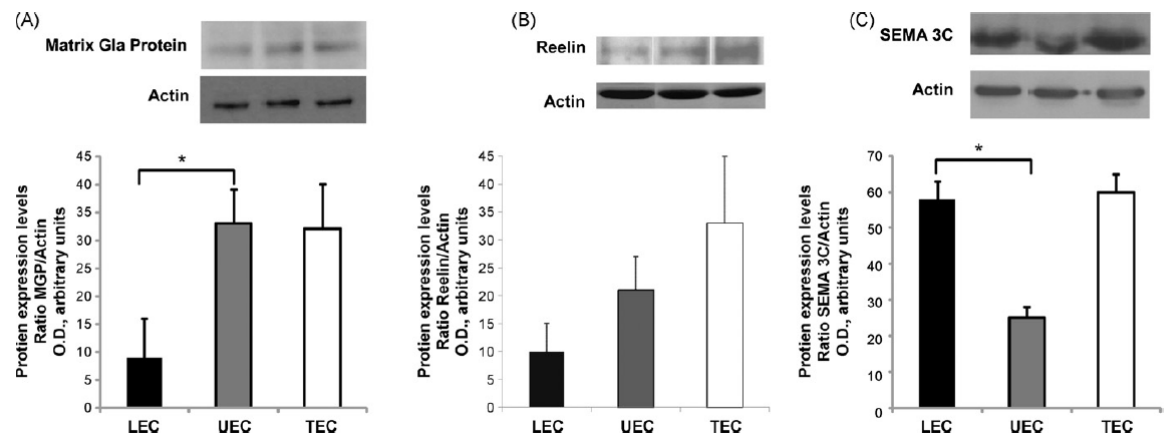


Figura 26. **(A)** Expresión de la proteína GLa de la matriz en el CxE humano. Se analizó la expresión de la proteína GLa de la matriz en Western blots de diferentes muestras de tejido correspondientes a CxE inferior (LEC), superior (UEC) y total (TEC). Se indica el promedio de siete determinaciones separadas. * $p < 0.05$. **(B)** Expresión de la proteína reelina en el CxE humano. Se analizó la expresión de la proteína reelina en Western blots de diferentes muestras de tejido correspondientes a CxE inferior (LEC), superior (UEC) y total (TEC). **(C)** Expresión de SEMA 3C en el CxE humano. Se analizó la expresión de la proteína SEMA 3C en Western blots de diferentes muestras de tejido correspondientes a CxE inferior (LEC), superior (UEC) y total (TEC). * $p < 0.05$.

4.7. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Se realizó estudio de polimorfismos de *APOE* y *MAPT* en 34 pacientes. La **Tabla 7** muestra los resultados, distribuidos por grupo de patología. En este caso, se ha distribuido los casos en los grupos de taupatías, Alzheimer y otros diagnósticos.

Grupos de patología	APOE						MAPT		
	e2/e2	e2/e3	e3/e3	e2/e4	e3/e4	e4/e4	H1/H1	H1/H2	H2/H2
Taupatías	0	0	9	0	1	0	9	1	0
Alzheimer	0	1	5	0	3	0	7	1	1
Otros	0	1	12	0	2	0	12	3	0
N (total) (%)	0	2 (5,9)	26 (76,5)	0	6 (17,6)	0	28 (82,4)	5 (14,7)	1 (2,9)

Tabla 7. Distribución de los pacientes con PGA de acuerdo con el status del polimorfismo *APOE* y de los alelos H1/H2 de *MAPT*. Los casos han sido agrupados teniendo en cuenta la patología asociada: Alzheimer, taupatías u otras.

En los 34 pacientes estudiados, sólo se encontraron los polimorfismos e3/e3, e2/e3, y e3/e4. El haplotipo predominante fue e3/e3 (76,5), que también fue el haplotipo predominante en los tres grupos de diagnóstico. No se identificó ningún caso e2/e2 en la serie de PGA, y e2/e3 fue minoritario en el grupo de Alzheimer y de otros diagnósticos. No se observó el alelo e2 en ningún caso de taupatía. No se identificó ningún caso e4/e4, y el haplotipo e3/e4 se observó en el 30% del grupo de Alzheimer, y en menor proporción en los otros grupos. No se observó asociación genética de ningún alelo de APOE con PGA (**Tabla 8**).

Portadores APOE e4	(-)	(+)	OR (p value)
EGA	28	6	1.15 (0.76)
CONT 1	958	179	-

Portadores APOE e2	(-)	(+)	OR (p value)
EGA	32	2	0.54 (0.39)
CONT 1	1136	133	-

Tabla 8. Análisis de asociación entre los alelos e4 y e2 con patología de GA. CONT 1: grupo de control, proyecto Vallecas.

En cuanto al polimorfismo HH, el haplotipo mayoritario fue H1/H1 (82,4%), seguido de H1/H2 (14,7%), mientras que H2/H2 (2,9%) sólo se observó en un caso incluido en el grupo de Alzheimer. El predominio de H1/H1 sobre H1/H2 fue superior en el grupo de las taupatías que en el resto de grupos. Cabe destacar que todos los casos con primer diagnóstico de patología de Lewy presentaron el haplotipo H1/H1. Se observó fuerte asociación del alelo H1 con PGA (**Tabla 9**).

MAPT	Genotipo			Alelos (%)		Asociación (H1 vs. H2)
	H1/H1	H1/H2	H2/H2	H1	H2	OR (p value)
DGA	28	5	1	61 (89.7%)	7 (10.3%)	3.45 (0.001)
CONT 1	110	118	21	338 (67.9%)	160 (32.1%)	-
CONT 2	98	81	15	277 (71.4%)	111 (28.6%)	-
CONT 3	170	120	17	460 (74.9%)	154 (25.1%)	-
CONT (1+2+3)	378	319	53	1075 (71.7%)	425 (28.3%)	-

Tabla 9. Análisis de asociación entre los alelos H1 y H2 con patología de GA. CONT 1, 2 y 3: grupos de control correspondientes a Bullido *et al.*, 2000; Combarros *et al.*, 2003; y Proyecto Vallecas, respectivamente. OR calculada con respecto al grupo de control global (CONT (1+2+3)).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. HALLAZGOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS

La frecuencia de PGA observada en la serie global de referencia (10.4%, con un rango de 8,8 a 11,6% para las series parciales de los diferentes bancos) se encuentra dentro del amplio rango de frecuencias descrito en la literatura. La gran variabilidad de los resultados depende, sin duda, de i) la proporción relativa de diferentes patologías en cada serie; ii) la distribución de edades al éxitus; iii) el origen de la serie (autopsias hospitalarias, estudio longitudinal, unidad de demencias); y iv) el método histológico utilizado para detectar la PGA. En series de autopsias de adultos, se han obtenido frecuencias de 4 a 9% (Braak and Braak, 1998; Tolnay and Clavaguera, 2004; Ferrer *et al.*, 2008), y proporciones superiores en series de pacientes de edad más avanzada (Saito *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2006). En centenarios, se ha descrito la presencia de PGA en el 100% de los casos, cuando se utiliza inmunotinción para AT8 (Pham *et al.*, 2011), y menor proporción si se utiliza anti-tau RD4 o tinción de Gallyas. En estudios longitudinales con donación de cerebro, se han observado frecuencias más altas que en las series de autopsias. En una serie longitudinal que incluía sujetos con demencia y sujetos cognitivamente intactos, se observó EGA en el 16% de los casos (Josephs *et al.* 2008). La frecuencia observada en nuestra serie es notablemente similar a la descrita por Martínez-Lage *et al.* (1997) en una serie de 300 autopsias consecutivas cuando se consideraron los casos de edad > 65 años (11,7%). Conviene destacar, sin embargo, que en nuestra serie global, es precisamente la serie parcial de edad media más baja (72 años), la del BTIN-HUFA, la que muestra una frecuencia de PGA mayor (11,6%). Es probable que al aumento de la frecuencia hayan contribuido los 7 pacientes estudiados en dicho centro con sospecha de ECJ por evolución rápidamente progresiva (< 2 años). Las taupatías, y en particular las taupatías 4R se encuentran entre las patologías identificadas en los casos con sospecha clínica de ECJ, en los que no se confirma enfermedad priónica en el estudio neuropatológico (Josephs *et al.*, 2009).

En cuanto a la edad de los casos de nuestra serie, es interesante observar una distribución normal de las edades al éxitus observadas (**Fig. 6**), con mediana = 78 años, mientras que la frecuencia de EGA por década de edad, a partir de los 50 años, sigue una curva ascendente con forma de sigma (**Fig. 7**). Este patrón es función de la frecuencia de PGA asociada a diferentes patologías, así como la frecuencia relativa de cada una de ellas en cada grupo de edad. En los grupos de edad más avanzada predominan los diagnósticos de Vascular y Alzheimer. En la serie de casos de EGA descrita en Josephs *et al.*, 2008 (n = 57), la edad media al éxitus fue de 90 años, y la edad media de inicio de la demencia 87 años. Las edades de inicio proporcionadas por publicaciones anteriores (Braak and Braak, 1998; Jellin-

ger, 1998; Tolnay *et al.*, 2001; Tolnay *et al.*, 2003) se encuentran entre los 75 y 80 años. Las diferencias entre la serie se deben, probablemente, a la diferente distribución de edad de los casos, aunque, como se comentará en el Ap. 5.2., también pueden depender de diferentes criterios de inclusión, especialmente en los estadios iniciales de PGA.

En la serie de Saito *et al.* (2004) se observó un predominio de mujeres, y en la de Josephs *et al.* (2008) el porcentaje de casos sin otra patología asociada fue del 64%. En nuestra serie, la proporción global de mujeres (52,8%) fue ligeramente superior a la de varones, y la ratio fue superior en los grupos de Alzheimer y Vascular. Como se ha indicado previamente, se trata de los grupos de edad más avanzada, y el predominio de mujeres en estos grupos de edad en las series de referencia (**Figura 3, Material Suplementario**) puede ser un factor determinante.

Se ha descrito reiteradamente la presencia de EGA en casos sin demencia (Josephs *et al.* 2008), y en casos de edad avanzada sin otros hallazgos patológicos relevantes (Knopman *et al.*, 2003), con mayor frecuencia en centenarios. En nuestra serie el 21,7% de los casos no había desarrollado demencia, y en este grupo las patologías asociadas fueron Parkinson, Vascular, ELA y PSP. Se observó un discreto predominio de estadio 1 de PGA en casos sin demencia, no significativo. A diferencia de otros grupos de patología incluidos en la serie (Alzheimer, DCB, Huntington, DFT, DCL), todas estas patologías pueden cursar sin demencia, por lo que nuestra serie sugiere, como otras anteriores, que la EGA puede no dar lugar a demencia, especialmente en estadios tempranos.

Martinez-Lage and Munoz, (1997) observaron asociación de EGA principalmente con PSP, en menor grado con DCB y E. de Pick, y con otras patologías neurodegenerativas, patología de tipo Lewy, enfermedad de motoneurona y AMS. Se ha descrito, asimismo, asociación con ECJ (Ferrer *et al.*, 2008), y combinación de más de una patología neurodegenerativa asociada (Liang *et al.*, 2005; Klos *et al.*, 2005). La frecuente combinación de PGA con otras taupatías 4R, especialmente con PSP, está bien documentada en la literatura (Simic, 2002; Togo *et al.*, 2002; Keith-Rokosh *et al.*, 2008). En distintas series, la combinación con patología de EA se ha correlacionado significativamente con la edad (Tolnay *et al.*, 1999; Fujino *et al.*, 2005). En nuestra serie, se observa un incremento gradual de la frecuencia de PGA, de EA, y de PGA + EA en grupos de edad creciente (**Fig. 11**). Nuestros resultados, al igual que los de series previas, sugieren que ambas taupatías se desarrollan y progresan de forma independiente, si bien cada una de ellas en correlación con la edad. Esta progresión en paralelo de PGA con la patología de EA se produce también cuando PGA aparece combinada con otra patología neurodegenerativa. En un estudio reciente, Soma *et al.* (2012) observaron PGA en el 38% de pacientes con ELA, y en ellos la presencia de PGA estaba en correlación con la edad de los pacientes.

5.2. HALLAZGOS NEUROPATOLÓGICOS

En nuestra serie, la PGA muestra una alta consistencia en cuanto a las lesiones celulares presentes y a las regiones cerebrales afectadas. La presencia de GA se asocia en todos los casos a pONF en la misma localización, con un alto grado de correlación (**Fig. 5, Material Suplementario**). En el córtex, tanto entorrinal como perirrinal, ambas lesiones pueden predominar en capas diferentes (p. ej, GA en capa II, y pONF en capas II, III y V), mientras que en los núcleos amigdalinos y en el córtex del hipocampo los GA se disponen en torno a las neuronas inmunorreactivas para tau. Esta distribución relativa de las lesiones es consistente con la localización de los GA en el árbol dendrítico de las neuronas que contienen pONF (neuronas estrelladas de la capa II y neuronas piramidales de las capas II, III y V). Mientras que el árbol dendrítico de las neuronas estrelladas se distribuye principalmente en la capa I, el de las células piramidales se extiende principalmente por su propia capa, con extensión apical de menor amplitud a las capas I y II (Amaral and Lavenex, 2007). La presencia de CB es constante, principalmente en la sustancia blanca inmediatamente en relación con las áreas de sustancia gris afectadas, y sugiere una afectación de los tractos neurales con origen en las poblaciones neuronales afectadas por pONF. En general pueden observarse asimismo CB en la sustancia gris, aunque es poco frecuente observarlos en los oligodendrocitos satélites de neuronas con pONF (salvo en casos con PSP asociada, datos no cuantificados). Las inclusiones astrocitarias características muestran una distribución menos regular, aunque en algunos casos pueden observarse con alta densidad, especialmente en córtex entorrinal y perirrinal.

En cuanto a la distribución de los ONF, se observa alto grado de correlación con otras lesiones de tipo Alzheimer (**Tabla 7**), mientras que la correlación con GA y pONF es de sentido negativo y se da principalmente en niveles anteriores (**Fig. 5, Material Suplementario**). Este hecho sugiere una relación local inversa entre la patología de tipo EA, con atrofia y pérdida neuronal, y la PGA. El análisis comparado de la distribución regional de ONF en casos con estadio de Braak bajo (≤ 2) y medio-alto (> 2), sugiere que las regiones afectadas por ONF y por GA y pONF son esencialmente las mismas, aunque con mínima afectación en los casos con estadio de Braak bajo (**Fig. 18**). No se puede descartar, pues, al igual que ocurre en otras taupatías 4R, que el desarrollo de ONF en determinadas regiones, se asocie a la progresión de la patología EGA.

En estudios anteriores se ha sugerido una mayor frecuencia de ONF en CA2 en casos de EGA (Thal *et al.*, 2005; Ishizawa *et al.*, 2002). En nuestra serie (**Fig. 12**) se observa una frecuencia moderada-alta de pONF en CA2-3 anterior (Nivel 2), que con frecuencia presenta un patrón focal en CA3, mientras que sólo se observa densidad moderada de ONF en CA2-3 anterior (**Fig. 18**) en casos con Braak > 2 . Es

probable, pues, que a este nivel se produzca un efecto de interacción o suma de la patología EGA con la patología EA.

Entre los sistemas de estadiaje publicados (Saito *et al.*, 2004; Thal *et al.*, 2005; Ferrer *et al.*, 2008), el que ha resultado de aplicación más sencilla es el de Thal *et al.* (2005), ya que se limita a los hallazgos en el LTM, y se puede aplicar atendiendo fundamentalmente a la densidad de GA en CxE y CA1 (estadio 1 vs estadio > 1) y a la extensión significativa de GA al CxP (estadio 2 vs. 3). En prácticamente todas las áreas seleccionadas, y en los 3 niveles coronales de estudio, se observó un aumento de intensidad con la progresión de los estadios (**Figs. 13 y 15**). Así mismo, cuando se ordenaron los casos por intensidad de GA en el córtex perirrinal de los 3 niveles coronales (**Fig. 19**), en casos sin patología de EA relevante, se obtuvo una gradación continua de los cambios, tanto en sentido ántero-posterior (Nivel 1 → Nivel 2 → Nivel 3), como en sentido medio-lateral (evidente en todos los casos cuando se observa la evolución de la densidad de GA desde el CxT hacia el CxP). Esta ordenación tenía una correspondencia prácticamente total en el estadiaje de Thal *et al.* (2005) (**Fig. 19**), y algo menor, pero evidente, en la distribución de la patología en el córtex del hipocampo, en los Niveles 2 y 3 (**Fig. 19**). Si bien el sentido de la progresión de la patología está descrito en Saito *et al.* (2004) y en Thal *et al.* (2005), el presente estudio pone de manifiesto los distintos ejes en los que, simultáneamente, se produce la progresión de la PGA (**Fig. 27**): 1) un eje ántero-posterior, 2) un eje medio-lateral, y 3) un tercer eje de progresión a lo largo del córtex del hipocampo. La distribución de la patología en la amígdala sugiere una progresión desde el n. BLVM hacia otros nn. basolaterales y el resto de nn. amigdalinos, mientras que la distribución en el CxE sugiere una progresión a partir del CxT, y en el plano anterior (Nivel 1), también a nivel del *g. ambiens*. Es notable que la gradación de intensidad descendente de la patología desde el CxT hacia el CxE lateral y medial, y desde CA1 distal (adyacente al subículum) hacia CA1 proximal y CA2 es paralela a la descrita en patología de EA (Lace *et al.*, 2009).

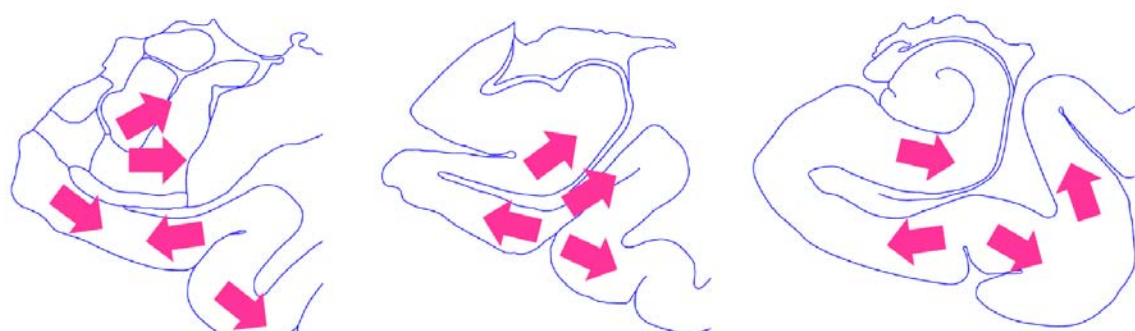


Figura 27. Principales ejes de avance de la PGA en los tres niveles ántero-posteriores evaluados.

El porcentaje global de esclerosis del hipocampo (17%) está dentro del rango descrito en series de demencias de edad avanzada (Nelson *et al.*, 2013), y, al igual que en estas series, es más elevado en casos de EA o DLFT. Tanto en casos de patología TDP como en otras patologías, en nuestra serie la presencia de EH se asocia significativamente a inclusiones inmunorreactivas para TDP-43 en el hipocampo (fundamentalmente en el giro dentado y en el córtex del hipocampo). Conviene resaltar el hecho de que, en el grupo de Alzheimer, aunque sólo el 25% de los casos mostraron EH, el 75% presentaba inclusiones inmunorreactivas para TDP-43. Recientemente, se ha observado asociación de patología de EGA e inclusiones inmunorreactivas para TDP en sujetos de edad avanzada cognitivamente conservados (Arnold *et al.*, 2013) [40% de sujetos EGA (+) frente a 19% de sujetos EGA (-)]. Por su parte, en ELA-TDP se ha descrito hasta un 38% de casos con EGA (Soma *et al.*, 2012). En una serie anterior, con menor número de casos (Fujishiro *et al.*, 2009), en pacientes con demencia o esquizofrenia se observó un 60% de casos con EGA e inclusiones TDP-43(+), y en algunos casos se observó colocalización de tau y TDP-43 en algunos GA y cuerpos neuronales. Nuestros resultados sugieren que la patología TDP puede tener un papel relevante en la asociación EA-EGA en sujetos de edad avanzada. Se ha descrito una mayor frecuencia de inclusiones TDP-43 (+) en pacientes con EA con afectación límbica más intensa (Josephs *et al.*, 2008b). También es relevante a este respecto la menor frecuencia de inclusiones TDP-43 (+) observada en los casos de EA con preservación relativa del hipocampo (*hippocampal sparing*), en comparación con los casos con afectación predominante del hipocampo (*limbic predominant*) (Murray *et al.*, 2011). En estos últimos casos la edad de inicio de la enfermedad era más elevada, con predominio de mujeres.

En estudios previos se ha planteado un posible papel del β -amiloide en el desarrollo de la PGA (Tolnay *et al.*, 1999; Thal *et al.*, 2008). Una patología de distribución tan similar a la de la EA en el LTM, al menos en sus primeras fases, y la existencia de un patrón regular de depósito de β -amiloide en el hipocampo (Thal *et al.*, 2005) podrían sugerir una relación patogénica entre ambas patologías, como parece claro que existe en la EA. En los casos de nuestra serie se ha registrado la frecuencia de placas neuríticas de acuerdo con el protocolo CERAD (Mirra *et al.*, 1991) y el estadio de β -amiloide en el hipocampo (Thal *et al.*, 2005). Ambas variables mostraron una fuerte correlación positiva con las restantes variables de patología EA, referidas a la patología neurofibrilar (**Tabla 7**), y mostraron una diferencia significativa entre los grupos de casos con PGA y estadio de Braak \leq II y $>$ II. Sobre la base de nuestros resultados, pues, no puede sugerirse que los depósitos de β -amiloide desempeñan un papel en el desarrollo de la PGA.

En cuanto a la patología de pequeño vaso, se observó igualmente una diferencia significativa entre los grupo con estadio de Braak más bajo y más alto, con una mayor proporción de casos con patología

vascular relevante en el grupo de Braak bajo. En la serie de referencia no se observó diferencia significativa de edad entre los casos con patología vascular significativa con y sin PGA asociada, por lo que está alta prevalencia de casos vasculares entre los casos con Braak bajo podría atribuirse a la patología vascular un factor de riesgo para el desarrollo de PGA (como parecen ser la patología de Alzheimer, las taupatías 4R, la patología de tipo Lewy, la patología TDP y otras patologías neurodegenerativas). En la presente serie no existe ningún caso de PGA sin otra patología neurodegenerativa asociada que no muestre patología vascular relevante. Este hecho contrasta con series previas en las que se equipara la ausencia de otra patología neurodegenerativa con la EGA “pura” (Josephs *et al.*, 2008).

5.3. ANÁLISIS MOLECULAR DE LA PROTEÍNA TAU

La posibilidad de clasificar las taupatías sobre la base de las isoformas de tau predominantes en el tejido cerebral en grandes grupos (taupatías 4R, 3R y 3R/4R) sugiere un papel central de la distribución relativa de isoformas en la patogenia de estas enfermedades, y sugiere al mismo tiempo la posibilidad de identificar la firma molecular de cada una de ellas (Avila, 2009). Resulta especialmente sugestiva la correlación existente entre las isoformas predominantes y las lesiones histológicas características de cada entidad. Las taupatías 4R, p.ej., que incluyen a la PSP, la DCB y la EGA como entidades más prevalentes, se presentan con frecuencia combinadas entre sí, e incluso en sus formas puras comparten lesiones histológicas características (Dickson *et al.*, 2011). En todas las taupatías 4R, incluso en entidades poco prevalentes que empiezan a conocerse mejor actualmente, como la taupatía con inclusiones gliales globulares (IGG), observamos inclusiones oligodendrogliales en forma de *coiled bodies* (Ahmed Z *et al.*, 2013). En cuanto a las inclusiones astrocitarias, que en muchas ocasiones son las que permiten diferenciar una enfermedad de otra (los astrocitos en penacho como característicos de la PSP y las placas astrocitarias características de la DCB), también a menudo aparecen en varias taupatías 4R (p.ej., los astrocitos *bush-like* en PGA e IGG).

En las dos fases del estudio molecular realizado en los pacientes de la serie aquí presentada, en casos con mínima carga de patología de tipo Alzheimer que pudiera afectar a los resultados, se ha identificado un patrón de isoformas característico de taupatía 4R si bien con un marcado predominio de la banda de 64 kDa, que no se había descrito hasta el momento actual. El marcaje de dicha banda con diversos anticuerpos indica que su componente principal es la isoforma 4R que contiene el exón 2 y no incluye el exón 3. En la primera fase del estudio (Rábano *et al.*, 2013, **Material Suplementario**), se tomaron amplias muestras del LTM medial, lo que podría haberle restado especificidad a estos hallazgos. Sin embargo, en una segunda fase (Rábano *et al.*, *submitted*, **Material Suplementario**) las muestras para Western-blot se tomaron selectivamente del córtex entorrinal y del córtex del hipocampo

de nuevos casos con mínima carga de patología de tipo Alzheimer. Los resultados fueron superponibles a los anteriores.

Conviene señalar que existen en la literatura pocos estudios de isoformas de tau en EGA, y que los estudios publicados se han basado en un pequeño número de casos. En Togo *et al.* (2002) se observó la inmunotinción de los GA con anticuerpos específicos para isoformas 4R (RD4) y no para isoformas 3R (RD3). Mediante un anticuerpo dirigido a tau total, se observaron en Western blot dos bandas principales alineadas con tau 4R (con o sin exón 2, respectivamente), y una banda de intensidad menor alineada con tau 3R con exón 2. Se describen estos hallazgos en un caso con Braak I, mientras que en 2 casos adicionales con estadio de Braak más alto no se observaba este patrón. En otro estudio (Zukhareva *et al.*, 2002), se analizaron por separado muestras de sustancia gris y de sustancia blanca, con resultados concordantes, y la observación en Western-blot de dos bandas de 64 y 69 kDa. En un tercer estudio (Tolnay *et al.*, 2002), que incluyó 2 casos de EGA con estadio de Braak I, se observaron dos bandas de 64 y 69 kDa y una banda menor de 74 kDa, mientras que en otros dos casos con estadios de Braak superiores se observó una banda adicional de 60 kDa. Los autores concluyen que no existe ninguna diferencia entre los patrones observados en PSP, DCB y EGA. En cuanto a las dos entidades principales del grupo de taupatías 4R, PSP y DCB, Arai *et al.* (2004) observaron un patrón distintivo de isoformas en casos de DCB, con presencia de formas de tau de bajo peso molecular.

La identificación de un patrón de isoformas distintivo de una entidad puede contribuir a definir el proceso patogénico que conduce a la formación de las inclusiones características de dicha patología. Se ha observado recientemente, p.ej., que la inserción de los exones 2 y 10 aumentan la tendencia de tau a la agregación, mientras que la inserción del exón 3 la disminuye (Zhong *et al.*, 2012). Otro factor importante en la generación de los GA es, sin duda, la distribución celular de las isoformas de tau hiperfosforilada. Los GA se forman en el árbol dendrítico de las neuronas afectadas (citadas y figuras), y la evidencia actual indica igualmente que se forman en aquellas neuronas que en las tinciones inmunohistoquímicas muestran tinción difusa de tau (pONF). Mientras que otras taupatías 4R contienen habitualmente neuronas con expresión difusa de tau hiperfosforilada (más frecuentes en DCB que en PSP), las inclusiones neuronales características se localizan en el cuerpo neuronal. Una de las claves para entender la formación de los GA puede estar, pues en la distribución celular de las isoformas de tau hiperfosforilada predominantes en esta entidad. Los hallazgos de los estudios aquí presentados pueden permitir un planteamiento de este problema más focalizado en la isoforma de tau predominante en PGA.

Recientemente, se ha observado que la acetilación de tau, específicamente de la lisina 280, es una característica de las inclusiones tau (+) de la patología de tipo Alzheimer, de PSP y DCB (Irwin *et al.*,

2012). Sin embargo, un estudio realizado mediante un anticuerpo que reconoce la acetilación de lisina 274 no ha observado esta modificación en EGA, lo que puede constituir otro rasgo distintivo de las isoformas de tau hiperfosforiladas en esta entidad.

En cuanto a los agregados de tau observados mediante microscopía electrónica, en estudios anteriores se han observado en EGA, además de los PHF característicos de la patología de tipo Alzheimer, filamentos rectos similares a los observados en otras taupatías 4R. Zuhareva *et al.* (2002) observaron filamentos rectos de 9 a 22 nm, con inmunorreactividad para PHF-1. En muestras procedentes de sustancia blanca observaron, además, filamentos más finos, de 9 a 10 nm, no inmunorreactivos para PHF-1. Otros estudios coinciden en la detección de filamentos rectos en casos de EGA, de 9 a 18 nm, y en la detección de filamentos más finos asociados a las inclusiones oligodendrogiales (Tolnay and Clavaguera, 2004). En los casos incluidos en el presente estudio, con estadio de Braak \leq II, el aislamiento de agregados de tau dio lugar en conjunto a una menor cantidad de filamentos que en los casos con estadio de Braak más elevado, con inmunorreactividad para anticuerpos para fosfo-tau, observándose así mismo ocasionales filamentos rectos como los descritos previamente en la literatura. No se observaron filamentos de menor diámetro. Sobre la base de estos resultados, no se reconoce un patrón distintivo de la PGA en microscopía electrónica. No obstante, es posible que el bajo rendimiento en la obtención de agregados en casos con PGA, tanto en forma de PHF como de filamentos rectos, pueda ser una característica de la PGA que deba ser estudiada más específicamente en el futuro.

5.4. ESTUDIO MORFOLÓGICO MEDIANTE INYECCIÓN INTRANEURONAL

Los datos aquí presentados fueron obtenidos en 3 de los 5 pacientes incluidos en el estudio (P9, P13 y P14), todos ellos con patología de tipo Alzheimer. No se han incorporado los datos del único paciente que mostraba patología combinada de GA porque no fue posible realizar un número suficiente de inyecciones neuronales. Las conclusiones aquí obtenidas son aplicables, pues, a las fases de desarrollo de la patología tau intraneuronal asociada a Alzheimer.

Mediante la inyección de Lucifer Yellow para visualizar en detalle la morfología dendrítica neuronal y la colocalización de tau hiperfosforilada, se han definido varios patrones progresivos de afectación dendrítica asociada a inclusiones de tau. El Patrón I se caracteriza por la inmunotinción difusa de tau con presencia mínima de agregados, mientras que las neuronas que muestran el Patrón II presentan ONF típicos. El patrón II se subdivide en los patrones IIa y IIb, en función del grado de desarrollo de los ONF (Patrón IIa, intermedio/avanzado; Patrón IIb, extremo). La inmunotinción más intensa de los

ONF intraneuronales se obtuvo con el anticuerpo PHF-1. La gran mayoría de las neuronas inmunorreactivas con PHF-1 mostraron una gran cantidad de tau agregada, lo que sugiere que el anticuerpo AT8 revela principalmente los estadios iniciales de la patología neurofibrilar, mientras que PHF-1 reconoce los estadios más avanzados (Blázquez-Llorca *et al.*, 2011; Braak *et al.*, 2006). Se analizaron las posibles alteraciones de las espinas dendríticas en las neuronas que presentaban cada uno de estos patrones de depósito de fosfo-tau. En las neuronas que presentaban el Patrón I de depósito, no se observaron alteraciones significativas de las espinas dendríticas, mientras que las neuronas que mostraban el Patrón II revelaron importantes alteraciones a este nivel. En un grado intermedio de patología neurofibrilar (Patrón IIa) se observaron diferentes alteraciones morfológicas que variaban entre los pacientes, principalmente una reducción del volumen y la longitud de las espinas (paciente P9), y una reducción de la densidad de espinas dendríticas (pacientes P13 y P14). En estadios más avanzados (Patrón IIb) se observó una intensa pérdida de espinas que afectaba incluso a la porción proximal de las dendritas. Esta pérdida secuencial de espinas dendríticas parece ser diferente de la que se observa en presencia de placas de β -amiloide, donde se observa una pérdida de espinas limitada al segmento dendrítico más próximo a las placas extracelulares, tanto si se encuentra en una región proximal como distal al cuerpo neuronal (Knafo *et al.*, 2009). La pérdida de espinas dendríticas asociada a la patología tau intracelular parece seguir una secuencia regular, iniciándose en la región distal de la dendrita y extendiéndose posteriormente a segmentos más proximales. Sin embargo, sobre la base de estos datos no puede establecerse si el Patrón I representa un estadio de preovillo que precede al Patrón II, o si se produce en una subpoblación de neuronas que representan así un estadio independiente. Los cambios aquí descritos se limitan a neuronas con depósitos inmunorreactivos para los anticuerpos AT8 y PHF-1, y no se puede descartar que se produzcan otras alteraciones en poblaciones neuronales con inclusiones reactivas para otros epitopos de fosfo-tau. Así, las neuronas que contenían ONF bien desarrollados (Patrón IIb) presentaban un árbol dendrítico relativamente pequeño, con dendritas delgadas y muy escasas espinas, independientemente de su reactividad para AT8 y PHF-1.

Como se ha indicado previamente, sobre la base de los datos neuropatológicos aquí presentados, no se puede descartar que en la PGA se produzca una generación de ONF a partir de pONF análoga a la que ocurre en la patología de tipo Alzheimer. Los únicos datos de que disponemos sobre la repercusión de la PGA sobre la morfología neuronal, y en particular sobre la morfología dendrítica, proceden del estudio de Thal *et al.*, 2008. Los autores compararon los hallazgos obtenidos en 3 casos de EGA con demencia, 4 casos de EA. El estudio morfológico se realizó mediante la implantación de cristales de Dil (un trazador neuronal retrógrado aplicable a tejido post mórtem) en las capas superiores del CxE, evaluándose posteriormente la detección del trazador en el córtex perirrinal (AB 35). De este

modo se estudió el árbol dendrítico de neuronas piramidales del AB 35 que proyectan al CxE. Las neuronas piramidales de los pacientes con EGA y EA moderada mostraban alteraciones en el árbol dendrítico. Numerosas dendritas basales de neuronas piramidales de las capas III y V mostraban un estrechamiento del calibre no observado en controles (estadio de Braak bajo). En los casos con EGA las espinas dendríticas eran más prominentes que en los controles, y mostraban un aspecto “tosco”. La formología de estas espinas “toscas” era similar a la observada en neuronas tau (+), con pONF, en los casos de EGA. Finalmente, en los casos con EA avanzada se observaba una notable reducción de las neuronas identificadas con el trazador, lo que indicaba desconexión entre el CxP y el CxE. Si bien los hallazgos no son enteramente comparables debido a la diferente metodología empleada en ambos estudios, el estudio de Thal *et al.* (2008) indica que en EGA las neuronas pueden presentar alteraciones importantes en la morfología dendrítica aunque no contengan ONF. A este respecto, habría que considerar, pues, que las neuronas con pONF (cuando consideramos sólo el cuerpo neuronal y las prolongaciones proximales en cortes finos) en PGA, podrían ser el equivalente de las neuronas con ONF (Patrón IIa y IIb) en EA. Alternativamente, en PGA podrían convivir neuronas con “pONF” en sentido estricto (sin GA) y con “ONF” (con GA).

5.5. EXPRESIÓN GÉNICA EN EL CÓRTEX ENTORRINAL

Los datos de microarrays, de PCR en tiempo real y de Western blot obtenidos revelan una mayor expresión génica y cantidad de proteína correspondientes a MGP, TAGLN, COL1A2 y RELN en las capas superiores del CxE, así como unos niveles más elevados de expresión génica y de proteína de SE-MA3C, FEZF2 y RXFP1 en las capas inferiores.

La proteína Gla de la matriz (MGP) se ha puesto en relación con las calcificaciones vasculares, en particular en procesos como el envejecimiento, la aterosclerosis y la diabetes (Shanahan *et al.*, 1998). Aunque se expresa principalmente en tejidos periféricos, también está presente en neuronas (Goritz *et al.*, 2007), si bien especialmente en el sistema nervioso periférico, donde actúa como reguladora de las proteínas morfogénicas del hueso (BMPs) en el sistema vascular. De hecho, un aumento de la expresión de MGP inhibe el crecimiento neuronal dependiente de BMP (Lein *et al.*, 2002), lo que puede tener una función en el desarrollo de las neuronas del sistema simpático (Moon and Birren, 2008). MGP podría actuar como una proteína ligadora de calcio en el espacio extracelular (Shanahan *et al.*, 1998), una función que comparte con otras proteínas extracelulares ligadoras de calcio, como la cadherina. En el hipocampo pueden observarse calcificaciones vasculares en precapilares y capilares del GD y en el stratum L-M de CA1, en el territorio vascular de la arteria hipocampal media. Estas calcificaciones, frecuentes en edad avanzada, se han puesto en relación con la esclerosis del hipocampo

(Wegiel *et al.*, 2002). Por otra parte, estudios en primates sugieren una relación, en determinadas capas corticales, entre la densidad vascular y la diferenciación y actividad metabólica neuronal durante el desarrollo cortical (Fonta and Imbert, 2002). Si bien no se ha estudiado específicamente la vascularización del CxE y su posible diferenciación laminar, la expresión de citocromo-oxidasa (CO) en el CxE de primates muestra un intenso patrón modular en las capas I y II (Hevner and Wong-Riley, 1992). En córtex cingular posterior, se ha observado una reducción de reactividad para CO en pacientes de EA, más acusada en la capa I (Valla *et al.* 2001).

La transgelina, también conocida como proteína de músculo liso 22 (SM22), es una proteína ligadora de actina localizada principalmente, pero no exclusivamente, en el músculo liso de vertebrados adultos (Li *et al.* 2008). El dominio intracelular de la proteína precursora del amiloide (APP) puede regular la expresión de transgelina (Muller *et al.*, 2007).

La reelina es una glicoproteína secretada que desempeña un papel importante en el desarrollo cerebral y en la formación de las capas corticales (Frotscher *et al.*, 1997; Herz and Chen, 2006). La expresión de reelina está alterada en EA (Botella-López *et al.* 2006), y un procesamiento anómalo de la reelina puede asociarse a disfunción neuronal (Chin *et al.*, 2007). Variantes genéticas de reelina pueden desempeñar un papel en la patogenia de la EA (Seripa *et al.*, 2008), y niveles elevados de agregados de reelina pueden facilitar el depósito de β -amiloide en placas (Knuesel *et al.*, 2009).

Las semaforinas constituyen una familia de moléculas implicadas en la dirección del crecimiento axonal, y la semaforina 3C también favorece la supervivencia de neuronas en cultivo (Moreno-Flores *et al.*, 2003), por lo que una disminución de los niveles de SEMA3C podría incrementar la vulnerabilidad neuronal en las capas superiores del CxE.

Otro gen con expresión disminuida en capas superiores es FEZF2, que desempeña un papel importante en la especificación de neuronas subcorticales (Leone *et al.*, 2008) y podría ser un marcador de las capas corticales inferiores (Chen *et al.*, 2008). El receptor de relaxina se expresa en tejido cerebral (Ma *et al.*, 2006), y su ligando, la relaxina, es un componente de la matriz extracelular que reduce la expresión de colágeno $1\alpha 2$ cuando se une a su receptor (Samuel *et al.*, 2007), lo que se correlaciona con el aumento observado en la expresión de COL1A2 en las capas superiores del CxE en nuestro estudio.

5.6. ASOCIACIÓN A POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Se realizó el genotipado para *APOE* y *MAPT* (H1/H2) en 34 de los 53 pacientes con PGA. El haplotipo *APOE* predominante fue e3/e3 (76,5%), que también fue el haplotipo predominante en los tres grupos de diagnóstico. No se identificó ningún caso e2/e2 en la serie de PGA, y e2/e3 fue minoritario en el grupo de Alzheimer y de otros diagnósticos. No se observó el alelo e2 en ningún caso de taupatía. No se identificó ningún caso e4/e4, y el haplotipo e3/e4 se observó en el 30% del grupo de Alzheimer, y en menor proporción en los otros grupos (**Tabla 7**). Estos resultados contrastan con los observados en series anteriores basadas en poblaciones de Europa Central, que describen una mayor proporción de casos con haplotipo e2 (Ghebremedhin et al., 1998; Tolnay et al., 1998; Togo et al., 2002). El predominio del haplotipo e3 en nuestra serie, con una alta proporción de homocigosis, puede depender de una mayor prevalencia de este haplotipo en las poblaciones del Sur de Europa (Calero et al., 2011).

No se observó asociación genética de ningún alelo de *APOE* con PGA (**Tabla 8**), en concordancia con un estudio previo basado en una amplia serie (Togo et al., 2002). Sin embargo, se observó una fuerte asociación de PGA con el alelo H1 de *MAPT*, lo que concuerda con resultados anteriores en PGA (Conrad et al., 2004), y en otras taupatías 4R (revisado en Avila et al., 2004).

No está claro como las isoformas de *APOE* o los haplotipos de *MAPT* podrían condicionar el desarrollo de una taupatía como la PGA. Se han descrito diferencias en las frecuencias genotípicas de *MAPT* y *APOE* en subtipos clínicos de otras taupatías, incluyendo la DLFT-tau (Short et al., 2002). Por otra parte, las isoformas de *APOE* podrían tener un efecto sobre la regulación de tau-quinasas y de los niveles intraneuronales de fosfo-tau (Hoe et al., 2006). En cuanto a *MAPT*, el haplotipo H1 es más eficiente en la inducción de la expresión génica que el haplotipo H2, lo que sugiere que cuando H2 está presente se expresa una cantidad menor de tau (Kwok et al., 2004). Así, pues, las diferencias en las isoformas de *APOE* y los haplotipos de *MAPT* podrían tener un efecto sobre la cantidad de tau total y fosfo-tau expresada, dos parámetros importantes para el desarrollo de las taupatías.

El número de pacientes portadores del haplotipo H2 en nuestra serie es demasiado pequeño ($n = 6$) como para sacar conclusiones en cuanto a una posible asociación de este alelo a un fenotipo determinado de PGA. Sin embargo, podría ser relevante que el 50% de los pacientes con este haplotipo se hayan presentado clínicamente como un síndrome neurológico rápidamente progresivo.

Finalmente, conviene destacar que se ha observado asociación del haplotipo H1/H1 con patología de tipo Lewy (presente en el 27% de los casos con PGA en nuestra serie) (Simón-Sánchez et al., 2009), y que este haplotipo es significativamente menos frecuente en los casos de EA atípica que muestran preservación relativa del hipocampo (Murray et al., 2011), lo que sugiere una relación de H1/H1 no

sólo con determinadas patologías (taupatías, 4R, patología de tipo Lewy), sino con la distribución de dichas patologías en el LTM.

5.7. IMPLICACIONES PARA UN MODELO PATOGENICO BASADO EN LA PROPAGACIÓN DE LA TAUPATÍA

Antes de que existiera suficiente evidencia experimental de la transmisibilidad de célula a célula de la mayoría de las proteínas patológicas asociadas a las enfermedades neurodegenerativas más prevalentes, los sistemas de estadiaje neuropatológico de estas patologías ya proporcionaban una fuerte sugerencia de la existencia de esta propagación y de las vías neurales implicadas (Braak *et al.*, 2003; Braak *et al.*, 2006; Brundin *et al.*, 2010). La extensión de las lesiones celulares características a partir de regiones cerebrales bien definidas y circunscritas (córtex entorrinal en Alzheimer, n. motor dorsal del vago y bulbo olfatorio en patología de Lewy, cuerpo del n. caudado en Huntington) se interpretó durante décadas exclusivamente en términos de vulnerabilidad selectiva neuronal. Hoy sabemos que la existencia de factores de vulnerabilidad selectiva (tipos neuronales, regiones cerebrales, factores genéticos, etc.) es compatible con una interpretación patogénica en términos de propagación de formas patológicas de proteína. A este respecto, las taupatías constituyen un paradigma experimental (Clavaguera *et al.*, 2009; Clavaguera *et al.*, 2013), y la taupatía asociada a la EA es uno de los objetivos principales de esta línea de investigación, por sus consecuencias directas sobre una enfermedad de alta prevalencia.

Sin embargo, tanto la EA como las taupatías esporádicas más frecuentes (PSP, DCB, E. de Pick) presentan extensas áreas de afectación del SNC en el estudio post mortem. De hecho, como se ha señalado recientemente (Arnold *et al.*, 2013), todas las enfermedades neurodegenerativas más comunes muestran, en sus fases avanzadas, extensa afectación de regiones corticales y subcorticales, incluyendo tronco cerebral y cerebelo, y se diferencian principalmente en las lesiones celulares características (no siempre específicas) y en el perfil lesional de estas lesiones. Solo las primeras fases de progresión de la taupatía de tipo Alzheimer permiten realizar inducciones sobre las poblaciones neuronales y las relaciones de conectividad neuronal originalmente implicadas en la posible propagación de tau. Lace *et al.* (2009) pusieron de manifiesto, mediante un detallado sistema de estadiaje de la patología tau en el LTM, que las áreas afectadas se encuentran estrechamente relacionadas por relaciones de conectividad conocidas. Así, el córtex entorrinal lateral, y especialmente sus capas superiores, donde observamos los cambios iniciales de la patología, proyecta a otras áreas con afectación temprana (estadio 1), como el segmento externo de la capa molecular del giro dentado y CA1 distal / subículo proximal. Las células pre- α proyectan también preferentemente al segmento externo de la capa mo-

lecular. Por su parte las células piramidales de CA1 distal / subículum proximal proyectan a áreas afectadas en el estadio 2: córtex entorrinal medial y células pri- α del córtex entorrinal. A su vez, las áreas afectadas en el estadio 2 proyectan hacia regiones afectadas en los estadios 3, 4 y 5. Por ejemplo, el córtex entorrinal medial proyecta a CA1 proximal / CA2 (estadio 3), subículum (estadio 4), capa interna de la molecular del GD (estadio 4) y CA3 (estadio 5). Las áreas afectadas en el estadio 3 proyectan a áreas características del estadio 4 (CA1 proyecta a subículum), y axones de la capa molecular interna (estadio 4) alcanzan CA4-3. Las neuronas afectadas en el estadio 5 (CA3-4) proyectan a su vez hacia CA1 y otras regiones del hipocampo.

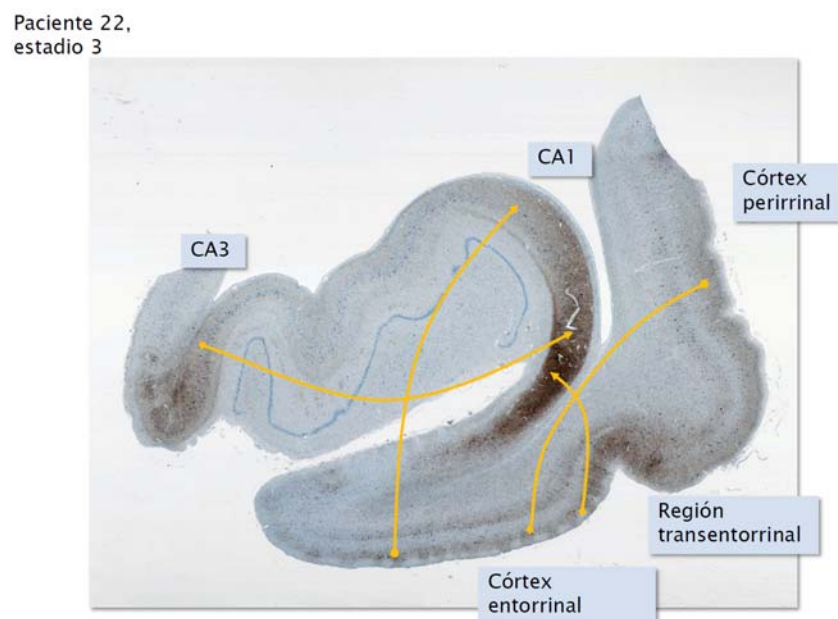


Figura 28. Imagen macro-microscópica de hipocampo anterior, inmunotinción para AT8, que muestra las áreas principales de afectación por PGA (estadio 3). Las flechas indican vías de conectividad conocidas entre dichas áreas.

La PGA afecta a las mismas regiones que la PTA en el LTM, aunque probablemente no afecte en todas ellas a las mismas poblaciones neuronales ni a las mismas relaciones de conectividad. Sin embargo, constituye un modelo más neto y mejor delimitado de propagación de patología tau, que podemos evaluar a través de lesiones altamente específicas, como los GA, que aparecen estrechamente relacionados con las poblaciones neuronales afectadas (**Fig. 28**). No disponemos de datos sobre las fases más iniciales de la PGA, y en todos los casos encontramos GA ya al menos en los nn. basolaterales de la amígdala y en los segmentos más anteriores del córtex entorrinal /gyrus ambiens y CA1 (precisamente las porciones d estas áreas corticales más próximas a los nn. basolaterales de la amígdala). Sin duda, es en este triángulo de poblaciones neuronales (nn. basolaterales de la amígdala, neuronas de las capas superficiales del CxE anterior y neuronas piramidales de CA1 anterior), donde surgen por

primera vez las lesiones características de la PGA. El hecho de que no podamos encontrar lesiones más iniciales o menos extendidas, a diferencia de lo que ocurre con los estadios I y II de Braak (tau), podría tener que ver con la velocidad relativa de progresión de esta patología, superior a la de la tauopatía de tipo Alzheimer. La PGA comparte con otra tauopatías 4R la extensa afectación glial, limitada principalmente en la PGA a la afectación de oligodendrocitos y astrocitos estrechamente asociados a las poblaciones neuronales afectadas.

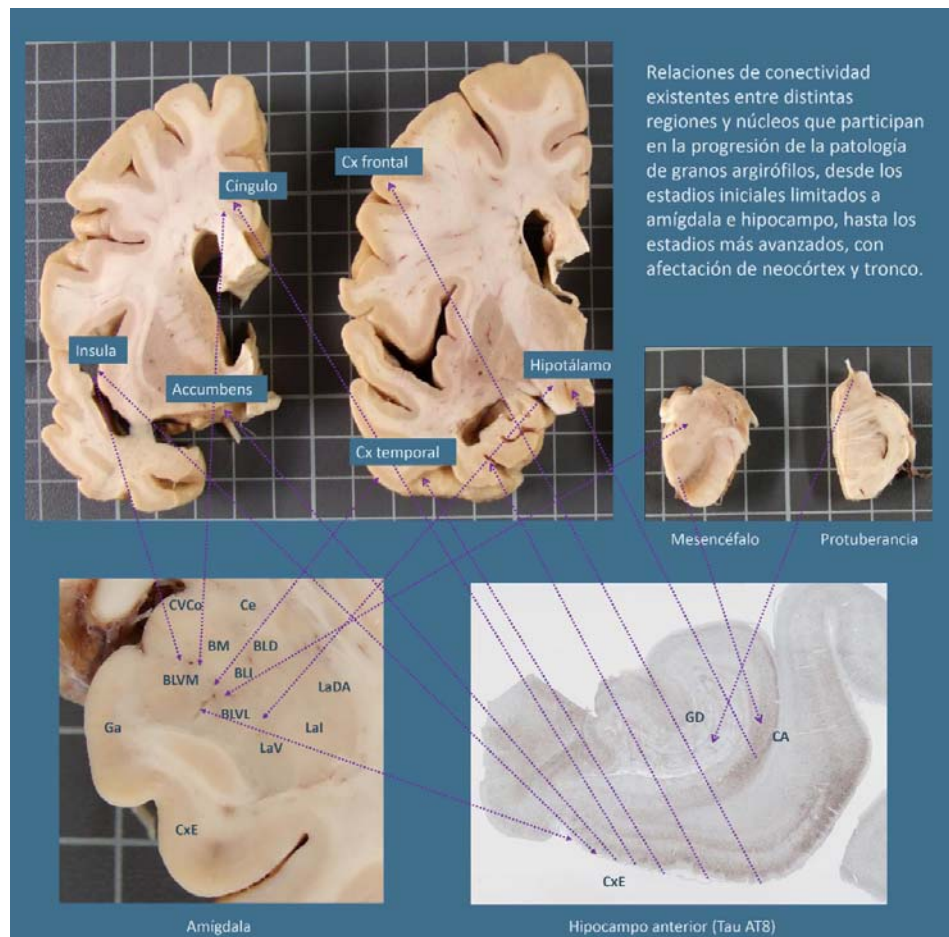


Figura 29. Conectividad entre las áreas de afectación por PGA en el LTM y fuera del LTM.

Las regiones cerebrales afectadas por la PGA fuera del LTM están directamente conectadas con las áreas del LTM inicialmente afectadas. De hecho, la existencia de estas áreas extratemporales de afectación es más frecuente en estadios más avanzados de PGA, pero también se da en estadios precoces en nuestra serie (**Fig. 29**).

Desde el punto de vista neuropatológico, la progresión de la PGA se traduce en un aumento de la intensidad lesional en áreas previamente afectadas (CxE y CA1), y en la extensión de la patología a lo

largo de varios ejes: 1) en sentido ántero-posterior, en sentido lateral hacia el córtex perirrinal, y en sentido proximal del córtex del hipocampo, hacia CA2-3. La extensión hacia distintos núcleos de la amígdala es menos regular, si bien en ocasiones muy intensa. Una diferencia sustancial con la progresión de la taupatía de tipo EA es la ausencia de afectación de la capa molecular del GD, si bien no es infrecuente la presencia de un escaso número de preovillos en la capa granular, más abundantes en casos asociados a otra taupatía esporádica. La escasa afectación del GD y la presencia de pONF y GA asociados a neuronas de la capa III del CxE sugiere un papel de la vía perforante menor (alvear) en la propagación de la PGA. Por lo demás, un hecho muy llamativo en la propagación de la patología (**Fig. 13, Fig. 17**) es la existencia de un frente de avance neto en el córtex perirrinal observable en cada caso. Esta progresión posría depender enteramente de fibras asociativas córtico-corticales entre CxE y CxP, como se puso de manifiesto en Thal *et al.*, 2008, o podría existir además una contribución de fibras asociativas cortas entre columnas corticales próximas.

La existencia de un perfil molecular más específico de PGA, aunque comparable al de otras taupatías 4R, como el que se ha puesto de manifiesto aquí, puede ser un buen instrumento para testar hipótesis sobre la propagación de esta patología en tejido humano (mediante la generación de anticuerpos específicos para este perfil molecular, p. ej.). La PGA tiene unas lesiones muy características, los GA, cuya formación debe de estar asociada a características físico-químicas específicas de la tau acumulada. La identificación de ciertos rasgos específicos en el perfil de tau en PGA puede contribuir a entender el origen de estas singulares lesiones celulares.

Por último, la PGA comparte con otras taupatías esporádicas, como se ha puesto de manifiesto en este estudio, su asociación al alelo H1 de *MAPT* como factor de riesgo genético, lo que constituye una vía para la exploración de la vulnerabilidad selectiva de determinadas poblaciones neuronales a esta patología.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. En series de pacientes procedentes de 3 bancos de cerebros (biobancos de muestras neurológicas), la presencia de PGA muestra una frecuencia dentro del amplio rango observado en otras series, y comparable a la de series de autopsias publicadas (10,4%).
2. Los pacientes con PGA muestran una edad media al éxitus elevada (78,7 años), especialmente en los grupos de pacientes en los que la PGA se asocia a E. de Alzheimer (86 años) y a patología vascular (84,2 años). Los pacientes con E. de Alzheimer y PGA asociada muestran una edad al éxitus significativamente superior a la de los pacientes de Alzheimer sin PGA. La asociación de PGA a EA se incrementa progresivamente con la edad.
3. Las patologías neurodegenerativas con mayor proporción de casos de PGA asociada fueron las taupatías esporádicas, la patología de tipo Lewy y la patología TDP, observándose asimismo casos aislados asociados a atrofia multisistémica y E. de Huntington. En todos los pacientes sin patología neurodegenerativa asociada, la patología vascular asociada era intensa. Si bien no existe ningún mecanismo patogénico conocido que contribuya a desencadenar la PGA (de un modo análogo a como se propone que los depósitos de β -amiloide contribuyen a desencadenar y acelerar la taupatía de la E. de Alzheimer), en la presente serie no existe ningún caso de PGA sin alguna patología relevante del SNC asociada, que podría actuar como desencadenante a través de un mecanismo común desconocido.
4. La PGA muestra una constelación de lesiones celulares altamente regular con una distribución escasamente variable en el LTM y en regiones extratemporales, que pueden ordenarse de acuerdo con un sistema de clasificación en 3 estadios. En el córtex perirrinal y el córtex del hipocampo el avance de la patología puede seguirse a lo largo de ejes anatómicos de progresión.
5. Las regiones afectadas por PGA en el LTM muestran relaciones de conectividad directa entre sí, y las regiones más precozmente afectadas (nn. basolaterales de la amígdala, córtex entorrinal y sector CA1 del hipocampo) muestran relaciones directas de conectividad con las áreas extratemporales más frecuentemente afectadas.
6. La PGA muestra un perfil molecular específico, dentro de los patrones observados en taupatías 4R, que puede observarse en casos con estadio de Braak bajo, en distintas áreas de afectación.
7. Las lesiones características de PGA evolucionan (en estadios progresivos) con independencia de las lesiones de tipo Alzheimer, tanto de tipo tau (ONF) como β -amiloide (placas). No se puede descartar que la progresión de la PGA de lugar por sí misma al desarrollo de ONF en determinadas

regiones (subículum y CA2-3), o que contribuya a la inducción a ese nivel lesiones de tipo Alzheimer.

8. La expresión génica en las capas superficiales del córtex entorrinal, en comparación con las capas profundas, revela una mayor expresión de proteínas asociadas a la matriz extracelular a ese nivel, lo que podría indicar una mayor susceptibilidad a la patología vascular en las áreas de inicio de la taupatía de tipo Alzheimer y la PGA. La PGA se asocia a patología de pequeño vaso en una proporción relevante de los casos de la presente serie.
9. La agregación de fosfo-tau en el soma neuronal se asocia a diversas alteraciones de las dendritas y de las espinas dendríticas en pacientes con patología de tipo Alzheimer, de acuerdo con patrones de afectación progresiva bien definidos. La extensa presencia de pONF asociados a GA en la patología de GA sugiere extensas alteraciones dendríticas y de las espinas dendríticas en esta patología.
10. No se ha observado asociación de la PGA con ningún alelo de APOE. Sin embargo, la PGA muestra una fuerte asociación con el alelo H1 del gen MAPT, al igual que otras taupatías esporádicas 4R.
11. La PGA puede constituir un modelo natural óptimo para el estudio de la propagación de tau en el LTM, y de otros factores asociados. El córtex perirrinal, en particular, podría permitir, con la metodología adecuada, el estudio del avance y la transmisión de la patología tau (+) de célula a célula.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi T, Saito Y, Hatsuta H, Funabe S, Tokumaru AM, Ishii K, Arai T, Sawabe M, Kanemaru K, Miyashita A, Kuwano R, Nakashima K, Murayama S. Neuropathological asymmetry in argyrophilic grain disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010 Jul;69(7):737-44.
- Ahmed Z, Bigio EH, Budka H, Dickson DW, Ferrer I, Ghetti B, Giaccone G, Hatanpaa KJ, Holton JL, Josephs KA, Powers J, Spina S, Takahashi H, White CL 3rd, Revesz T, Kovacs GG. Globular glial tauopathies (GGT): consensus recommendations. *Acta Neuropathol*. 2013 Oct;126(4):537-44.
- Alladi S, Xuereb J, Bak T, Nestor P, Knibb J, Patterson K, Hodges JR. Focal cortical presentations of Alzheimer's disease. *Brain*. 2007 Oct;130(Pt 10):2636-45.
- Aguzzi A, Rajendran L. The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids. *Neuron*. 2009 Dec 24;64(6):783-90.
- Amaral D and Lavenex P. Hippocampal neuroanatomy. In: *The Hippocampus Book*, Andersen P, Morris R, Amaral T, Bliss T, O'Keefe J eds. Oxford UP, New York, 2007.
- Alafuzoff I, Arzberger T, Al-Sarraj S, Bodi I, Bogdanovic N, Braak H, Bugiani O, Del-Tredici K, Ferrer I, Gelpi E, Giaccone G, Graeber MB, Ince P, Kamphorst W, King A, Korkolopoulou P, Kovacs GG, Larionov S, Meyronet D, Monoranu C, Parchi P, Patsouris E, Roggendorf W, Seilhean D, Tagliavini F, Stadelmann C, Streichenberger N, Thal DR, Wharton SB, Kretzschmar H. Staging of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease: a study of the BrainNet Europe Consortium. *Brain Pathol*. 2008; 18:484–496.
- Agosta F, Vessel KA, Miller BL, et al. Apolipoprotein E ϵ 4 is associated with disease-specific effects on brain atrophy in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 2018–22.
- Arai T, Ikeda K, Akiyama H, et al. Identification of amino-terminally cleaved tau fragments that distinguish progressive supranuclear palsy from corticobasal degeneration. *Ann Neurol*. 2004; 55:72–9.
- Arnold SE, Toledo JB, Appleby DH, Xie SX, Wang LS, Baek Y, Wolk DA, Lee EB, Miller BL, Lee VM, Trojanowski JQ. A comparative survey of the topographical distribution of signature molecular lesions in major neurodegenerative diseases. *J Comp Neurol*. 2013 Jul 24. doi: 10.1002/cne.23430. [Epub ahead of print]
- Asaoka T, Tsuchiya K, Fujishiro H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Iseki E, Oda T, Onaya M, Tominaga I. Argyrophilic grain disease with delusions and hallucinations: a pathological study. *Psychogeriatrics*. 2010 Jun;10(2):69-76.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev*. 2004; 84(2):361-84.
- Avila J. The tau code. *Front Aging Neurosc*. 2009. 1 (1).

Baker, M. et al. Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy. *Hum. Mol. Genet.* 1999; 8, 711–715.

Bancher C, Brunner C, Lassmann H, Budka H, Jellinger K, Wiche G, Seitelberger F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Wisniewski HM. Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1989; 477:90–99.

Benavides-Piccione R, Fernaud-Espinosa I, Robles V, Yuste R, Defelipe J. Age-Based Comparison of Human Dendritic Spine Structure Using Complete Three-Dimensional Reconstructions. *Cereb Cortex.* 2012; 23:1798-810.

Berriman J, Serpell LC, Oberg KA, Fink AL, Goedert M, Crowther RA. Tau filaments from human brain and from in vitro assembly of recombinant protein show cross-beta structure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:9034– 038.

Botella-Lopez A, Burgaya F, Gavin R, Garcia-Ayllon MS, Gomez-Tortosa E, Pena-Casanova J, Urena JM, Del Rio JA, Blesa R, Soriano E, J Saez-Valero. Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease, *Proc Natl Acad Sci.U.S.A.* 2006; 103: 5573–5578.

Botez G, Probst A, Ipsen S, Tolnay M. Astrocytes expressing hyperphosphorylated tau protein without glial fibrillary tangles in argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathol.* 1999 Sep;98(3):251-6.

Braak H. Architectonics of the human telencephalic cortex. New York-Springer Verlag, 1980.

Braak H, Braak E, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease. A 3rd location of paired helical filaments outside of neurofilament tangles and neuritic plaques. *Neurosci Lett.* 1986; 65:351–355.

Braak H, Braak E. Argyrophilic grains: characteristic pathology of cerebral cortex in cases of adult onset dementia without Alzheimer changes. *Neurosci Lett.* 1987 Apr 23;76(1):124-7.

Braak H, Braak E. Neuropil threads occur in dendrites of tangle-bearing nerve cells. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1988; 14:39–44.

Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82(4):239-59.

Braak H, Braak E. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging.* 1995 May-Jun;16(3):271-8.

Braak H, Braak E. Argyrophilic grain disease: frequency of occurrence in different age categories and neuropathological diagnostic criteria. *J Neural Transm* 1998; 105: 801–19.

Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2003 Mar-Apr;24(2):197-211.

Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K (2006) Staging of Alzheimer disease-associated

neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol.* 2006 Oct;112(4):389-404.

Braak H, Del Tredici K. The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta Neuropathol.* 2011 Feb;121(2):171-81. 15.

Braak H, Del Tredici K. Alzheimer's pathogenesis: is there neuron-to-neuron propagation? *Acta Neuropathol.* 2011;121:589–595.

Broca P. Anatomie comparé des circonvolutions cerebrales: Le grand lobe limbique et la scissure limbic dans la serie des mammiferes. *Rev Anthropol.* 1878; 1: 385. Ser. 382.

Brundin P, Melki R, Kopito R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Apr;11(4):301-7.

Buée L, Bussi re T, Bu e-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000 Aug; 33(1):95-130.

Bullido MJ, Aldudo J, Frank A, Coria F, Avila J, Valdivieso F. A polymorphism in the tau gene associated with risk for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2000; 278(1-2):49-52.

Calero O, Hortiguela R, Bullido MJ, Calero M. Apolipoprotein E genotyping method by real time PCR, a fast and cost-effective alternative to the TaqMan and FRET assays. *J Neurosci Methods.* 2009; 183(2):238–240.

Calero O, Bullido MJ, Clarimon J, et al. Genetic cross-interaction between APOE and PRNP in sporadic Alzheimer's and Creutzfeldt-Jakob diseases. *PLoS One.* 2011; 6(7):e22090.

Carmel G, Mager EM, Binder LI, Kuret J. The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem.* 1996; 271:32789–32795.

Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R.A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A.K., Beibel, M., Staufenbiel, M., et al..Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat. Cell Biol.* 2009; 11: 909–913.

Clavaguera F, Akatsu H, Fraser G, Crowther RA, Frank S, Hench J, Probst A, Winkler DT, Reichwald J, Staufenbiel M, Ghetti B, Goedert M, Tolnay M. Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jun 4; 110(23):9535-40.

Chen B, Wang SS, Hattox AM, Rayburn H, Nelson SB, McConnell SK. The Fezf2-Ctip2 genetic pathway regulates the fate choice of subcortical projection neurons in the developing cerebral cortex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; 105: 11382–11387.

Chin J, Massaro CM, Palop JJ, Thwin MT, Yu GQ, Bien-Ly N, Bender A, Mucke L. Reelin depletion in the entorhinal cortex of human amyloid precursor protein transgenic mice and humans with Alzheimer's disease, *J. Neurosci.* 2007;27: 2727–2733.

- Combarros O, Rodero L, Infante J, Palacio E, Llorca J, Fernández-Viadero C, Peña N, Berciano J. Age-dependent association between the Q7R polymorphism in the Saitohin gene and sporadic Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2003; 16(3):132-5.
- Conrad C, Vianna C, Schultz C, et al. Molecular evolution and genetics of the Saitohin gene and tau haplotype in Alzheimer's disease and argyrophilic grain disease. *J Neurochem*. 2004; 89(1):179–188.
- Cras P, Smith MA, Richey PL, Siedlak SL, Mulvihill P, Perry G. Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*. 1995; 89:291–295.
- Crowther RA. Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Mar 15; 88(6):2288-92.
- Cruchaga C, Vidal-Taboada JM, Ezquerra M, Lorenzo E, Martinez-Lage P, Blazquez M, Tolosa E; Iberian Atypical Parkinsonism Study Group Researchers, Pastor P. 5'-upstream variants of CRHR1 and MAPT genes associated with age at onset in progressive supranuclear palsy and cortical basal degeneration. *Neurobiol. Dis*. 2009; 33, 164–170.
- de Calignon A, Polydoro M, Suárez-Calvet M, William C, Adamowicz DH, Kopeikina KJ, Pitstick R, Sahara N, Ashe KH, Carlson GA, Spire-Jones TL, Hyman BT. Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron*. 2012; 73, 685–697.
- Dickson DW, Kouri N, Murray ME, Josephs KA. Neuropathology of frontotemporal lobar degeneration-tau (FTLD-tau). *J Mol Neurosci*. 2011 Nov;45(3):384-9.
- Ding ZT, Wang Y, Jiang YP, Yoshida M, Mimuro M, Inagaki T, Iwase T, Hashizume Y. Argyrophilic grain disease: frequency and neuropathology in centenarians. *Acta Neuropathol*. 2006; 111, 320–8.
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Delacourte A, Frisoni G, Fox NC, Galasko D, Gauthier S, Hampel H, Jicha GA, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Sarazin M, de Souza LC, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol* 2010; 9: 1118–27.
- Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*. 2009 Jul; 118(1):5-36.
- Endoh R, Ogawara M, Iwatsubo T, Nakano I, Mori H. Lack of the carboxyl terminal sequence of tau in ghost tangles of Alzheimer's disease. *Brain Res*. 1993; 601:164–172.
- Ferrer I, Barrachina M, Tolnay M et al. Phosphorylated protein kinases associated with neuronal and glial tau deposits in argyrophilic grain disease. *Brain Pathol* 2003; 13: 62–78.
- Ferrer I, Santpere G, van Leeuwen FW. Argyrophilic grain disease. *Brain*. 2008; 131:1416-1432.

Fonta C, Imbert M. Vascularization in the primate visual cortex during development. *Cereb Cortex*. 2002 Feb; 12(2):199-211.

Frotscher M. Dual role of Cajal-Retzius cells and reelin in cortical development *Cell Tissue Res*. 1997; 290: 315–322.

Frost, B., Jacks, R.L., and Diamond, M.I.. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J. Biol. Chem*. 2009; 284: 12845–12852.

Fujino Y, Wang DS, Thomas N, Espinoza M, Davies P, Dickson DW. Increased frequency of argyrophilic grain disease in Alzheimer disease with 4R tau-specific immunohistochemistry. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005 Mar; 64(3):209-14.

Fujishiro H, Uchikado H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Yokota O, Tsuchiya K, Togo T, Iseki E, Hirayasu Y. Accumulation of phosphorylated TDP-43 in brains of patients with argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathol*. 2009 Feb; 117(2):151-8.

Gearing M, Olson DA, Watts R, Mirra SC. Progressive supranuclear palsy: neuropathological and clinical heterogeneity. *Neurology*. 1994; 44(6):1015-24.

Gefen T, Gasho K, Rademaker A, Lalehzari M, Weintraub S, Rogalski E, Wieneke C, Bigio E, Geula C, Mesulam MM. Clinically concordant variations of Alzheimer pathology in aphasic versus amnesic dementia. *Brain*. 2012 May; 135(Pt 5):1554-65.

Gertz HJ, Xuereb J, Huppert F, Brayne C, McGee MA, Paykel E, Harrington C, Mukaetova-Ladinska E, Arendt T, Wischik CM. Examination of the validity of the hierarchical model of neuropathological staging in normal aging and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 1998 Feb; 95(2):154-8.

Ghebremedhin E, Schultz C, Botez G, et al. Argyrophilic grain disease is associated with apolipoprotein E epsilon 2 allele. *Acta Neuropathol*. 1998; 96(3):222–224.

Ghebremedhin E, Schultz C, Thal DR, Del Tredici K, Rueb U, Braak H. Genetic association of argyrophilic grain disease with polymorphisms in alpha-2 macroglobulin and low-density lipoprotein receptor-related protein genes. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2002; 28(4):308–313.

Giannakopoulos P, Hof PR, Kövari E, Vallet PG, Herrmann FR, Bouras C. Distinct patterns of neuronal loss and Alzheimer's disease lesion distribution in elderly individuals older than 90 years. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996 Dec; 55(12):1210-20.

Giannakopoulos P, von Gunten A, Kovari E, Gold G, Herrmann FR, Hof PR, Bouras C (2007) Stereological analysis of neuropil threads in the hippocampal formation: relationships with Alzheimer's disease neuronal pathology and cognition. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2007 Jun; 33(3):334-43.

Goritz C, Thiebaut R, Tessier LH, Nieweg K, Moehle C, Buard I, Dupont JL, Schurgers LJ, Schmitz G, Pfrieder FW. Glia-induced neuronal differentiation by transcriptional regulation. *Glia*. 2007; 55: 1108–1122.

Graeber MB, Kösel S, Grasbon-Frodl E, Möller HJ, Mehraein P. Histopathology and APOE genotype of the first Alzheimer disease patient, Auguste D. *Neurogenetics*. 1998 Mar; 1(3):223-8.

Greenberg SG, Davies P. A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87(15):5827–5831.

Guo JL, Lee, VM.. Seeding of normal Tau by pathological Tau conformers drives pathogenesis of Alzheimer-like tangles. *J Biol Chem*. 2011; 286:15317–15331.

Hardy J, Revesz T. The spread of neurodegenerative disease. *N Engl J Med*. 2012 May 31; 366(22):2126-8.

Herz J, Chen Y. Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7: 850–859.

Hevner RF, Wong-Riley MT. Entorhinal cortex of the human, monkey, and rat: metabolic map as revealed by cytochrome oxidase. *J Comp Neurol*. 1992 Dec 15; 326(3):451-69.

Hoe HS, Freeman J, Rebeck GW. Apolipoprotein E decreases tau kinases and phospho-tau levels in primary neurons. *Mol Neurodegener*. 2006; 1:18.

Höglinger GU, Melhem NM, Dickson DW, Sleiman PM, Wang LS, Klei L, Rademakers R, de Silva R, Litvan I, Riley DE, van Swieten JC, Heutink P, Wszolek ZK, Uitti RJ, Vandrovcova J, Hurtig HI, Gross RG, Maetzler W, Goldwurm S, Tolosa E, Borroni B, Pastor P; PSP Genetics Study Group, Cantwell LB, Han MR, Dillman A, van der Brug MP, Gibbs JR, Cookson MR, Hernandez DG, Singleton AB, Farrer MJ, Yu CE, Golbe LI, Revesz T, Hardy J, Lees AJ, Devlin B, Hakonarson H, Müller U, Schellenberg GD. Identification of common variants influencing risk of the tauopathy progressive supranuclear palsy. *Nat Genet*. 2011 Jun 19; 43(7):699-705.

Horowitz PM, Patterson KR, Guillozet-Bongaarts AL, Reynolds MR, Carroll CA, Weintraub ST, Bennett DA, Cryns VL, Berry RW, Binder LI. Early N-terminal changes and caspase-6 cleavage of tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2004; 24:7895–7902.

Houlden H, Baker M, Morris HR, MacDonald N, Pickering-Brown S, Adamson J, Lees AJ, Rossor MN, Quinn NP, Kertesz A, Khan MN, Hardy J, Lantos PL, St George-Hyslop P, Munoz DG, Mann D, Lang AE, Bergeron C, Bigio EH, Litvan I, Bhatia KP, Dickson D, Wood NW, Hutton M. Corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy share a common tau haplotype. *Neurology*. 2001; 56: 1702–1706.

Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL. Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science*. 1984; 225:1168–1170.

Hyman BT, Trojanowski JQ . Editorial on consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute working group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997; 56:1095–1097.

Hyman BT. New neuropathological criteria for Alzheimer's disease. *Arch Neurol*. 1998; 55:1174–1176.

Hyman BT. Amyloid-dependent and amyloid-independent stages of Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2011 Aug; 68(8):1062-4.

Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, Dickson DW, Duyckaerts C, Frosch MP, Masliah E, Mirra SS, Nelson PT, Schneider JA, Thal DR, Thies B, Trojanowski JQ, Vinters HV, Montine TJ. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2012 Jan; 8(1):1-13.

Ikeda K, Akiyama H, Kondo H, Haga C. A study of dementia with argyrophilic grains. Possible cytoskeletal abnormality in dendrospinal portion of neurons and oligodendroglia. *Acta Neuropathol*. 1995; 89: 409–14

Ilieva EV, Kichev A, Naudí A, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otín M. Mitochondrial dysfunction and oxidative and endoplasmic reticulum stress in argyrophilic grain disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011 Apr;70(4):253-63.

Insausti R, Tunon T, Sobreviela T, Insausti AM, Gonzalo LM. The human entorhinal cortex: a cytoarchitectonic analysis. *J Comp Neurol*. 1995; 355: 171-98.

Insausti R and Amaral D. Hippocampal Formation. In: *The Human Nervous System 2nd Ed.* Paxinos G, Mai JK eds. Academic Press, London, 2004.

Ishizawa Z, Ko L-W, Cookson N, Davis P, Espinoza M, Dickson DW. Selective neurofibrillary degeneration of the hippocampal CA2 sector is associated with four-repeat tauopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61: 1040–1047.

Jellinger KA. Dementia with grains (argyrophilic grain disease). *Brain Pathol*. 1998 Apr;8(2):377-86.

Jellinger KA, Attems J. Neurofibrillary tangle-predominant dementia: comparison with classical Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 2007; 113: 107–17.

Jicha GA, Abner EL, Schmitt FA, Kryscio RJ, Riley KP, Cooper GE, Stiles N, Mendiondo MS, Smith CD, Van Eldik LJ, Nelson PT. Preclinical AD Workgroup staging: pathological correlates and potential challenges. *Neurobiol Aging*. 2012 Mar;33(3):622.e1-622.e16.

Josephs KA, Whitwell JL, Parisi JE, Knopman DS, Boeve BF, Geda YE, Jack CR Jr, Petersen RC, Dickson DW. Argyrophilic grains: a distinct disease or an additive pathology? *Neurobiol Aging*. 2008; Apr; 29(4): 566-73.

Josephs KA, Whitwell JL, Knopman DS, et al. Abnormal TDP-43 immunoreactivity in AD modifies clinicopathologic and radiologic phenotype. *Neurology* 2008; 70: 1850–57.

Josephs KA, Ahlskog JE, Parisi JE, Boeve BF, Crum BA, Giannini C, Petersen RC. Rapidly progressive neurodegenerative dementias. *Arch Neurol*. 2009 Feb; 66(2):201-7.

Keith-Rokosh J, Ang LC. Progressive supranuclear palsy: a review of co-existing neurodegeneration. *Can J Neurol Sci*. 2008 Nov; 35(5):602-8.

Klos KJ, Josephs KA, Parisi JE, Dickson DW. Alpha-synuclein immunohistochemistry in two cases of co-occurring idiopathic Parkinson's disease and motor neuron disease. *Mov Disord*. 2005; 20: 1515–20.

Knuesel I, Nyffeler M, Mormede M, Muhia M, Meyer U, Pietropaolo S, Yee BK, Pryce CR, LaFerla FM, Marighetto A, Feldon J. Age-related accumulation of Reelin in amyloid-like deposits, *Neurobiol Aging*. 2009; 30: 697–716.

Knopman DS, Parisi JE, Salviati A, Floriach-Robert M, Boeve BF, Ivnik RJ, Smith GE, Dickson DW, Johnson KA, Petersen LE, McDonald WC, Braak H, Petersen RC. Neuropathology of cognitively normal elderly. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003 Nov; 62(11):1087-95.

Kovacs T, Cairns NJ, Lantos PL. Olfactory centres in Alzheimer's disease: olfactory bulb is involved in early Braak's stages. *Neuroreport*. 2001; 12:285–288.

Knafo S, Alonso-Nanclares L, Gonzalez-Soriano J, Merino-Serrais P, Fernaud-Espinosa I, Ferrer I, et al. Wide-spread changes in dendritic spines in a model of Alzheimer's disease. *Cereb Cortex*. 2009; 19: 586–92.

Kovacs GG, Pittman A, Revesz T, Luk C, Lees A, Kiss E, Tariska P, Laszlo L, Molnár K, Molnar MJ, Tolnay M, de Silva R. MAPT S305I mutation: implications for argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathol*. 2008 Jul; 116(1):103-18.

Kwok JB, Teber ET, Loy C, et al. Tau haplotypes regulate transcription and are associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2004; 55(3):329–334.

Lace G, Savva GM, Forster G, de Silva R, Brayne C, Matthews FE, Barclay JJ, Dakin L, Ince PG, Wharton SB; MRC-CFAS. Hippocampal tau pathology is related to neuroanatomical connections: an ageing population-based study. *Brain*. 2009 May; 132(Pt 5):1324-34.

Lavenex, P. Functional anatomy, development, and pathology of the hippocampus. In: *The clinical neurobiology of the hippocampus*. Ed.: T. Bartsch, OUP, 2012.

Lein PJ, Beck HN, Chandrasekaran V, Gallagher PJ, Chen HL, Lin Y, Guo X, Kaplan PL, Tiedge H, Higgins D. Glia induce dendritic growth in cultured sympathetic neurons by modulating the balance between bone morphogenetic proteins (BMPs) and BMP antagonists. *J. Neurosci*. 2002; 22:10377–10387.

Leone DP, Srinivasan K, Chen B, Alcamo E, McConnell SK. The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Curr. Opin. Neurobiol*. 2008; 18: 28–35.

Li M, Li S, Lou Z, Liao X, Zhao X, Meng Z, Bartlam M, Rao Z, Crystal structure of human transgelin. *J. Struct. Biol*. 2008; 162: 229–236.

Liang TW, Forman MS, Duda JE, McCluskey L, Trojanowski JQ, Siderowf A. Multiple pathologies in a patient with a progressive neurodegenerative syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005; 76: 252–5.

Liu, L., Drouet, V., Wu, J.W., Witter, M.P., Small, S.A., Clelland, C., and Duff, K.. Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo. *PLoS ONE*. 2012; 7, e31302.

Ma S, Shen PJ, Burazin TC, Tregear GW, Gundlach AL, Comparative localization of leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor-7 (RXFP1) mRNA and [33P]-relaxin binding sites in rat brain: restricted somatic co-expression a clue to relaxin action? *Neuroscience*. 2006; 141: 329–344.

Maclean PD. Some psychiatric implications of physiological studies on frontotemporal portion of limbic system (visceral brain). *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1952; 4: 407-18.

Mandelkow EM, Mandelkow E. Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Jul; 2(7):a006247.

Martin JH. *Neuroanatomy text and atlas*. Fourth edition. McGraw Hill, 2012.

Martinez-Lage P, Munoz DG. Prevalence and disease associations of argyrophilic grains of Braak. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997; 56(2):157-64.

J.K. Mai, J. Assheuer, G. Paxinos, *Atlas of the Human Brain*, Academic Press, San Diego, 2004.

McKee AC, Au R, Cabral HJ, Kowall NW, Seshadri S, Kubilus CA, Drake J, Wolf PA. Visual association pathology in preclinical Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006 Jun; 65(6):621-30.

Meyer A. The selective regional vulnerability of the brain and its relation to psychiatric problems. *Proc Roy Soc Med*. 1936; 29: 1175-81.

Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability in the hippocampus: relationship to neurological diseases and mechanisms for differential sensitivity of neurons to stress. In: *The clinical neurobiology of the hippocampus*. Ed.: T. Bartsch, OUP, 2012.

Mikkonen M, Pitkänen A, Soininen H, Alafuzoff I, Miettinen R. Morphology of spiny neurons in the human entorhinal cortex: intracellular filling with Lucifer yellow. *Neuroscience*. 2000; 96: 515-522.

Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, van Belle G, Berg L. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1991 Apr; 41(4):479-86.

Montine TJ, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Dickson DW, Duyckaerts C, Frosch MP, Masliah E, Mirra SS, Nelson PT, Schneider JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Vinters HV, Hyman BT; National Institute on Aging; Alzheimer's Association. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. *Acta Neuropathol*. 2012; 123:1–11.

Moon JI, Birren SJ. Target-dependent inhibition of sympathetic neuron growth via modulation of a BMP signaling pathway. *Dev Biol*. 2008 Mar 15; 315(2):404-17.

Moreno-Flores MT, Martin-Aparicio E, Martin-Bermejo MJ, Agudo M, McMahon S, Avila J, Diaz-Nido J, Wandosell F. Semaphorin 3C preserves survival and induces neuritogenesis of cerebellar granule neurons in culture. *Neurochem*. 2003; 87: 879–890.

Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L. The many faces of tau. *Neuron*. 2011 May 12; 70(3):410-26.

Muller T, Concannon CG, Ward MW, Walsh CM, Tirniceriu AC, Tribl F, Kogel D, Prehn JH, Egensperger R. Modulation of gene expression and cytoskeletal dynamics by the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *Mol. Biol. Cell*. 2007; 18: 201–210.

Munoz DG, Wang D. Tangle-associated neuritic clusters. A new lesion in Alzheimer's disease and aging suggests that aggregates of dystrophic neurites are not necessarily associated with beta/A4. *Am J Pathol.* 1992; 140:1167–1178.

Murray ME, Graff-Radford NR, Ross OA, Petersen RC, Duara R, Dickson DW. Neuropathologically defined subtypes of Alzheimer's disease with distinct clinical characteristics: a retrospective study. *Lancet Neurol.* 2011 Sep; 10(9):785-96.

Nelson PT, Braak H, Markesbery WR. Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009 Jan; 68(1):1-14.

Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Del Tredici K, Duyckaerts C, Frosch MP, Haroutunian V, Hof PR, Hulette CM, Hyman BT, Iwatsubo T, Jellinger KA, Jicha GA, Kövari E, Kukull WA, Leverenz JB, Love S, Mackenzie IR, Mann DM, Masliah E, McKee AC, Montine TJ, Morris JC, Schneider JA, Sonnen JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Wisniewski T, Woltjer RL, Beach TG. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012 May; 71(5):362-81.

Nelson PT, Smith CD, Abner EL, Wilfred BJ, Wang WX, Neltner JH, Baker M, Fardo DW, Kryscio RJ, Scheff SW, Jicha GA, Jellinger KA, Van Eldik LJ, Schmitt FA. Hippocampal sclerosis of aging, a prevalent and high-morbidity brain disease. *Acta Neuropathol.* 2013 Aug; 126(2):161-77.

Newell KL, Hyman BT, Growdon JH, Hedley-Whyte ET. Application of the National Institute on Aging (NIA)-Reagan Institute criteria for the neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999; 58:1147–1155.

Nonaka, T., Watanabe, S.T., Iwatsubo, T., and Hasegawa, M. Seeded aggregation and toxicity of alpha-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J. Biol. Chem.* 2010; 285, 34885–34898.

O'Brien RJ, Resnick SM, Zonderman AB, Ferrucci L, Crain BJ, Pletnikova O, Rudow G, Iacono D, Riudavets MA, Driscoll I, Price DL, Martin LJ, Troncoso JC. Neuropathologic studies of the Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA). *J Alzheimers Dis.* 2009; 18(3):665-75.

Papez J. A proposed mechanism of emotion. *Arch Neurol Psychiatry.* 1937; 38: 725-43.

Perez M, Valpuesta JM, de Garcini EM, et al. Ferritin is associated with the aberrant tau filaments present in progressive supranuclear palsy. *Am J Pathol.* 1998; 152(6):1531–1539.

Pham CT, de Silva R, Haïk S, Verny M, Sachet A, Forette B, Lees A, Hauw JJ, Duyckaerts C. Tau-positive grains are constant in centenarians' hippocampus. *Neurobiol Aging.* 2011; Jul; 32(7): 1296-303.

Pittman AM, Myers AJ, Abou-Sleiman P, et al. Linkage disequilibrium fine mapping and haplotype association analysis of the tau gene in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *J Med Genet.* 2005; 42: 837–46.

Pollanen P, Markiewicz P, Bergeron C, Goh MC. Twisted ribbon structure of paired helical filaments revealed by atomic force microscopy. *Am J Pathol.* 1994; 144: 869–873.

Porzig R, Singer D, Hoffmann R. Epitope mapping of mAbs AT8 and Tau5 directed against hyperphosphorylated regions of the human tau protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 358: 644–649.

Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2010 Jan 28; 362(4):329-44.

Rademakers R, Melquist S, Cruts M, et al. High-density SNP haplotyping suggests altered regulation of tau gene expression in progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet.* 2005; 14: 3281–92.

Ravits JM, La Spada AR. ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: deconstructing motor neuron degeneration. *Neurology.* 2009 Sep 8; 73(10):805-11.

Reinwald S, Westner IM, Niedermaier N. Rapidly progressive Alzheimer's disease mimicking Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol.* 2004 Aug; 251(8):1020-2.

Roberson ED, Searce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid β -induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science.* 2007; 316: 750–754.

Saito Y, Nakahara K, Yamanouchi H, Murayama S. Severe involvement of ambient gyrus in dementia with grains. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002; 61: 789–96.

Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M, Arai T, Tanaka N, Kakuta Y, Yamanouchi H, Murayama S. Staging of argyrophilic grains: an age-associated tauopathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004; 63(9):911-8.

Samuel CS, Lekgabe ED, Mookerjee I. The effects of relaxin on extracellular matrix remodeling in health and fibrotic disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007; 612: 88–103.

SantaCruz KS, Sonnen JA, Pezouh MK, Desrosiers MF, Nelson PT, Tyas SL. Alzheimer disease pathology in subjects without dementia in 2 studies of aging: the Nun Study and the Adult Changes in Thought Study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2011 Oct; 70(10):832-40.

Sergeant N, Delacourte A, Buée L. Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Jan 3; 1739(2-3):179-97.

Seripa D, Matera MG, Franceschi M, Daniele A, Bizzarro A, Rinaldi M, Panza F, Fazio VM, Gravina C, D'Onofrio G, Solfrizzi V, Masullo C, Pilotto A. The RELN locus in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 2008; 14: 335–344.

Schmidt C, Wolff M, Weitz M, Bartlau T, Korth C, Zerr I. Rapidly progressive Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2011 Sep; 68(9):1124-30.

Schmidt C, Haik S, Satoh K, Rábano A, Martinez-Martin P, Roeber S, Brandel JP, Calero-Lara M, de Pedro-Cuesta J, Laplanche JL, Hauw JJ, Kretschmar H, Zerr I. Rapidly progressive Alzheimer's disease: a multicenter update. *J Alzheimers Dis.* 2012; 30(4):751-6.

Schneider JA, Aggarwal NT, Barnes L, Boyle P, Bennett DA. The neuropathology of older persons with and without dementia from community versus clinic cohorts. *J Alzheimers Dis.* 2009; 18(3):691-701.

Scott IS, Lowe JS. The ubiquitin-binding protein p62 identifies argyrophilic grain pathology with greater sensitivity than conventional silver stains. *Acta Neuropathol.* 2007 Apr; 113(4):417-20.

Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011; 1:a006189.

Shanahan CM, Proudfoot D, Farzaneh-Far A, Weissberg PL. The role of Gla proteins in vascular calcification. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Exp.* 1998; 8: 357–375.

Short RA, Graff-Radford NR, Adamson J, Baker M, Hutton M. Differences in tau and apolipoprotein E polymorphism frequencies in sporadic frontotemporal lobar degeneration syndromes. *Arch Neurol.* 2002; 59(4):611–615.

Simic G. Pathological tau proteins in argyrophilic grain disease. *Lancet Neurol.* 2002 Sep; 1(5):276.

Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D, Paisan-Ruiz C, Lichtner P, Scholz SW, Hernandez DG, Krüger R, Federoff M, Klein C, Goate A, Perlmutter J, Bonin M, Nalls MA, Illig T, Gieger C, Houlden H, Steffens M, Okun MS, Racette BA, Cookson MR, Foote KD, Fernandez HH, Traynor BJ, Schreiber S, Arepalli S, Zonozi R, Gwinn K, van der Brug M, Lopez G, Chanock SJ, Schatzkin A, Park Y, Hollenbeck A, Gao J, Huang X, Wood NW, Lorenz D, Deuschl G, Chen H, Riess O, Hardy JA, Singleton AB, Gasser T. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 2009; 41: 1308–1312.

Small SA, Schobel SA, Buxton RB, Witter MP, Barnes CA. A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2011 Sep 7; 12(10):585-601.

Smith DA, Lantos PL. A case of combined Pick's disease and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1983 Jul; 46(7):675-7.

Soma K, Fu YJ, Wakabayashi K, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. Co-occurrence of argyrophilic grain disease in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2012 Feb; 38(1):54-60.

Sonnen JA, Santa Cruz K, Hemmy LS, Woltjer R, Leverenz JB, Montine KS, Jack CR, Kaye J, Lim K, Larson EB, White L, Montine TJ. Ecology of the aging human brain. *Arch Neurol.* 2011 Aug; 68(8):1049-56.

Soto C. Transmissible proteins: expanding the prion heresy. *Cell.* 2012 May 25;149(5):968-77

Spruston and McBain. Structural and functional properties of hippocampal neurons. In: *The Hippocampus Book*, Andersen P, Morris R, Amaral T, Bliss T, O'Keefe J eds. Oxford UP, New York, 2007.

Squire LR, Stark CE, Clark RE. The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci.* 2004;27:279-306.

Stefansson, H. *et al.* A common inversion under selection in Europeans. *Nat. Genet.* 2005; 37: 129–137.

Steuerwald GM, Baumann TP, Taylor KI, Mittag M, Adams H, Tolnay M, Monsch AU. Clinical characteristics of dementia associated with argyrophilic grain disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2007; 24(3):229-34.

Sundar, P.D. et al. Two sites in the MAPT region confer genetic risk for Guam ALS/PDC and dementia. *Hum. Mol. Genet*. 2007; 16: 295–306.

Suzuki WA and Amaral DG. Where are the perirhinal and parahippocampal cortices? A historical overview of the nomenclature and boundaries applied to the primate medial temporal lobe. *Neuroscience* 2003; 120: 893-906.

Thal DR, Hartig W, Schober R. Stage-correlated distribution of type 1 and 2 dystrophic neurites in cortical and hippocampal plaques in Alzheimer's disease. *J Brain Res* 1998; 39:175–181.

Thal DR, Rüb U, Schultz C, Sassin I, Ghebremedhin E, Del Tredici K, Braak E, Braak H. Sequence of Abeta-protein deposition in the human medial temporal lobe. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000; 59:733–748.

Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of Abeta deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*. 2002; 58:1791–1800.

Thal DR, Schultz C, Botez G, Del Tredici K, Mrak RE, Griffin WS, Wiestler OD, Braak H, Ghebremedhin E. The impact of argyrophilic grain disease on the development of dementia and its relationship to concurrent Alzheimer's disease-related pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2005; Jun; 31(3), 270-9.

Thal DR, Capetillo-Zarate E, Galuske RA. Tracing of temporo-entorhinal connections in the human brain: cognitively impaired argyrophilic grain disease cases show dendritic alterations but no axonal disconnection of temporo-entorhinal association neurons. *Acta Neuropathol*. 2008; 115(2):175-83.

Togo T, Dickson DW. Ballooned neurons in progressive supranuclear palsy are usually due to concurrent argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathol*. 2002; 104: 53-6.

Togo T, Cookson N, Dickson DW. Argyrophilic grain disease: neuropathology, frequency in a dementia brain bank and lack of relationship with apolipoprotein E. *Brain Pathol*. 2002; 12(1):45–52.

Tolnay M, Spillantini MG, Goedert M, Ulrich J, Langui D, Probst A. Argyrophilic grain disease: widespread hyperphosphorylation of tau protein in limbic neurons. *Acta Neuropathol*. 1997; 93: 477–83.

Tolnay M, Mistl C, Ipsen S, Probst A. Argyrophilic grains of Braak: occurrence in dendrites of neurons containing hyperphosphorylated tau protein. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1998; 24: 53–9.

Tolnay M, Probst A, Monsch AU, Staehelin HB, Egensperger R. Apolipoprotein E allele frequencies in argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathol*. 1998; 96(3):225–227.

Tolnay M, Calhoun M, Pham HC, Egensperger R, Probst A. Low amyloid (Abeta) plaque load and relative predominance of diffuse plaques distinguish argyrophilic grain disease from Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1999 Aug; 25(4):295-305.

Tolnay M, Monsch AU, Probst A. Argyrophilic grain disease. A frequent dementing disorder in aged patients. *Adv Exp Med Biol*. 2001; 487:39-58.

- Tolnay M, Sergeant N, Ghestem A, Chalbot S, De Vos RA, Jansen Steur EN, Probst A, Delacourte A (2002) Argyrophilic grain disease and Alzheimer's disease are distinguished by their different distribution of tau protein isoforms. *Acta Neuropathol.* 2002; Oct; 104(4): 425-34.
- Tolnay M, Clavaguera F. Argyrophilic grain disease: a late-onset dementia with distinctive features among tauopathies. *Neuropathology* 2004; 24: 269–83.
- Trabzuni D, Wray S, Vandrovcova J, Ramasamy A, Walker R, Smith C, Luk C, Gibbs JR, Dillman A, Hernandez DG, Arepalli S, Singleton AB, Cookson MR, Pittman AM, de Silva R, Weale ME, Hardy J, Ryten M. MAPT expression and splicing is differentially regulated by brain region: relation to genotype and implication for tauopathies. *Hum Mol Genet.* 2012 Sep 15; 21(18):4094-103.
- Uchihara T, Nakamura A, Yamazaki M, Mori O. Evolution from pretangle neurons to neurofibrillary tangles monitored by thiazin red combined with Gallyas method and double immunofluorescence. *Acta Neuropathol.* 2001; 101:535–539.
- Uchihara T, Tsuchiya K, Nakamura A, Akiyama H. Argyrophilic grains are not always argyrophilic -distinction from neurofibrillary tangles of diffuse neurofibrillary tangles with calcification revealed by comparison between Gallyas and Campbell-Switzer methods. *Acta Neuropathol.* 2005 Aug; 110(2):158-64.
- Valla J, Berndt JD, Gonzalez-Lima F. Energy hypometabolism in posterior cingulate cortex of Alzheimer's patients: superficial laminar cytochrome oxidase associated with disease duration. *J Neurosci.* 2001 Jul 1; 21(13):4923-30.
- Verghese PB, Castellano JM, Holtzman DM. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol* 2011; 10: 241–52.
- VV.AA. Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y otras Encefalopatías Espongiformes Transmisibles Humanas. Guía de información y recomendaciones para personal sanitario. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, 2003.
- Wakabayashi K, Takahashi H. Pathological heterogeneity in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Neuropathology.* 2004; 24:79-86.
- Wang D, Munoz DG. Qualitative and quantitative differences in senile plaque dystrophic neurites of Alzheimer's disease and normal aged brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1995; 54:548–556.
- Wang LN, Zhu MW, Feng YQ, Wang JH. Pick's disease with Pick bodies combined with progressive supranuclear palsy without tuft-shaped astrocytes: a clinical, neuroradiologic and pathological study of an autopsied case. *Neuropathology.* 2006 Jun; 26(3):222-30.
- Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci.* 2007; 25: 59–68.

Wegiel J, Kuchna I, Wisniewski T, de Leon MJ, Reisberg B, Pirttila T, Kivimaki T, Lehtimaki T. Vascular fibrosis and calcification in the hippocampus in aging, Alzheimer disease, and Down syndrome. *Acta Neuropathol.* 2002 Apr; 103(4):333-43.

Wegmann S, Jung YJ, Chinnathambi S, Mandelkow EM, Mandelkow E, Muller DJ. Human tau isoforms assemble into ribbon-like fibrils that display polymorphic structure and stability. *J Biol Chem.* 2010; 285: 27302– 27313.

Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad SciUSA.* 1975; 72: 1858–1862.

Wharton SB, Brayne C, Savva GM, Matthews FE, Forster G, Simpson J, Lace G, Ince PG; Medical Research Council Cognitive Function and Aging Study. Epidemiological neuropathology: the MRC Cognitive Function and Aging Study experience. *J Alzheimers Dis.* 2011; 25(2):359-72.

Zhong Q , Congdon EE, Nagaraja HN, Kuret J. Tau isoform composition influences rate and extent of filament formation. *J Biol Chem.* 2012; 287(24): 20711–20719.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

8. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Circunvolución	Lámina	Células	Fibras
Giro dentado	Capa polimórfica		
	Capa granular	Células granulares	
	Capa molecular	Interneuronas	Fibras septales, comisulares y asociativas (1/3 interno). Vía perforante (2/3 externos)
Córtex del hipocampo (CA)	<i>Str. lacunosum-moleculare</i>		Vía perforante.
	<i>Str. radiatum</i>		Fibras asociativas CA3-CA3. Colaterales de Schaffer. Fibras septales y comisurales.
	<i>Str. lucidum</i>		Fibras musgosas (CA3)
	Capa de células piramidales	Células piramidales	
	<i>Str. oriens</i>	Interneuronas	Fibras asociativas CA3-CA3. Colaterales de Schaffer.
	Alveus		Fibras eferentes de células piramidales

Figura 1. Estructura laminar del córtex del hipocampo.

Estadio	LTM	Nn. subcorticales	Isocórtex
I	Escasos ONF en las neuronas pre- α del CxT. ONF aislados en la capa pre- α del CxE, y en el sector CA1 del hipocampo	ONF aislados en los nn. magnocelulares del prosencéfalo anterior, y en el n. antero-dorsal del tálamo.	
II	Mayor intensidad de los cambios en el CxT, que se atenúan al aproximarse al CxE. Escasos ONF en CA1, especialmente en la proximidad del subiculum.	El n. basalis y el n. antero-dorsal del tálamo siguen mostrando escasos cambios.	Se pueden observar algunos ONF aislados en áreas isocorticales.
III	Afectación intensa de la capa pre- α , en CxE y CxT. Se pueden observar "ovillos fantasma" a este nivel, así como algunos ONF en las células pre- α y pre- β . La afectación de CA1 es de escasa intensidad. Empezan a aparecer ONF en las neuronas piramidales del subiculum. En cuanto a CA2-4, solo se observan ONF en grandes células multipolares de CA4, en la vecindad del giro dentado.		La afectación del isocórtex es mínima. En algunos sujetos, se observan escasos ONF y HN en capas III y V de porciones basales de áreas asociativas frontales, temporales y occipitales.
IV	Afectación muy intensa de la capa pre- α , con abundantes "ovillos fantasma" en CxE y CxT, y afectación considerable de las capas pre- α y pre- β . Frecuentes ONF en CA1, con afectación leve del subiculum y de células multipolares en CA4. En la amígdala, los nn. corticomediales contienen frecuentes PN, mientras que los nn. basolaterales muestran predominio de ONF y HN.	Afectación leve de porciones basales del claustrum. Pueden aparecer ONF en neuronas grandes de porciones basales del putamen y n. accumbens. La afectación es algo más intensa en los núcleos reuniens y tuberomamilar. Se observan frecuentes ONF y HN en el n. antero-dorsal del tálamo.	Afectación leve de isocórtex asociativo. Áreas sensitivas primarias y córtex motor primario libres o con ocasionales PN en la capa III.
V	Abundantes "ovillos fantasma" en la capa pre- α y en la capa profunda de pre- α del CxE. Afectación clara de las capas pre- β y pre- γ . Pequeños ONF y numerosas HN en las capas parvocelulares del presubiculum y transubiculum. Afectación de todos los componentes de la formación del hipocampo. Abundantes HN en la capa de células piramidales del subiculum. En CA1, mayor densidad de ONF en la proximidad del subiculum, y mayor en la capa externa que en la interna, con escasas HN a ese nivel. Ocasionalmente ONF en el <i>stratum oriens</i> . En CA1, se observan dos densas bandas de HN, una en la mitad externa del <i>stratum radiatum</i> , y otra delimitando el <i>stratum oriens</i> . Los cambios en CA2 son muy variables entre individuos, con ONF que se extienden a las dendritas apicales y basales. Algunos ovillos en CA3 y CA4, y ocasionales ONF de pequeño tamaño en el GD.	Mayor intensidad de afectación en los nn. subcorticales previamente afectados. Cambios iniciales en n. antero-ventral del tálamo, que incluye una red de abundantes procesos argirófilos. Además, se aprecian algunos ONF y HN en el n. tuberoso lateral del hipotálamo y en la sustancia nigra compacta.	La afectación es intensa en isocórtex. Si la afectación es escasa, los cambios están limitados a la región retrosplenial, la porción basal de la cara medial y la cara inferior de los lóbulos temporal y occipital. Posteriormente, se afectan las porciones antero-basales de la ínsula y el córtex orbitofrontal. Cuando los cambios están más extendidos estas son las zonas que muestran afectación más intensa. Se observan abundantes ONF en la capa III del córtex temporal, a excepción de la circunvolución superior. Afectación de prácticamente todas las áreas asociativas isocorticales. Sólo se observan escasas PN en la capa III de córtex sensitivos y motor primarios.
VI	Intensa pérdida neuronal en las capas pre- α y pre- β , con abundantes "ovillos fantasma" y gliosis. Las capas parvocelulares del parasubiculum y transubiculum contienen abundantes ONF de pequeño tamaño y una densa red de HN. El hipocampo está repleto de ONF. Frecuentes ONF en el GD, e intensa pérdida neuronal y frecuentes "ovillos fantasma" en CA1. El subiculum contiene una cantidad moderada de ovillos, pero con una densa red de HN.	Intensa afectación de núcleos subcorticales, que no permite diferenciar entre estadios. Afectación del n. reticular del tálamo (especialmente sus porciones antero-dorsales). ONF en el n. tuberoso lateral del hipotálamo. Afectación del sistema extrapiramidal: neuronas grandes y de mediano tamaño del n. estriado y de la sustancia nigra compacta.	En las áreas sensitivas primarias hay una densa red de HN con escasos ONF en la capa V, que se puede observar en el córtex estriado (no en el córtex motor primario, donde sólo se producen ciertos cambios neurofibrilares en la capa III). Estos cambios también se pueden observar en el córtex somatosensorial y en el córtex auditivo primarios.

Figura 2. Estadios de Braak para la progresión de la patología tau (+) de tipo Alzheimer.

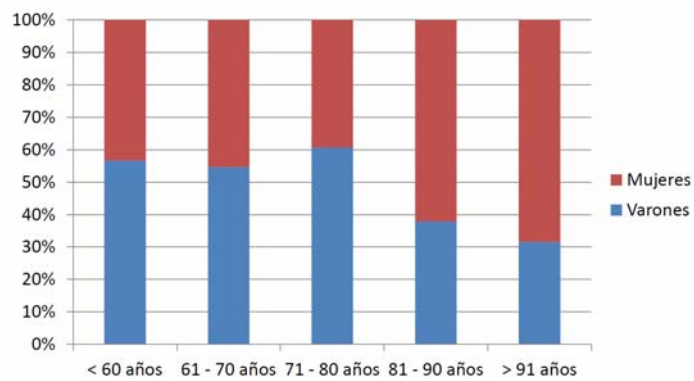


Figura 3. Distribución de sexos, por grupo de edad, en la serie conjunta de casos de origen.

Bloque-área	Técnicas para diagnóstico neuropatológico						
	H/E	Beta-A	Tau AT100	A-sín	Ubiq	TDP-43	Solocr
Bulbo olfatorio							
Córtex orbitofrontal							
Córtex frontal (CERAD)							
Córtex cingular anterior							
Córtex prerrolándico							
Córtex parietal (CERAD)							
Córtex temporal (CERAD)							
Córtex insular anterior							
Córtex occipital lateral							
Córtex c. calcarina							
Amígdala							
Hipocampo anterior							
Hipocampo, cuerpo							
Sust. blanca periventr.							
N. caudado (cabeza)							
N. lenticular							
Hipotálamo							
Tálamo							
Mesencéfalo							
Protuberancia							
Bulbo raquídeo							
Médula cervical							
Médula espinal							
Vermis cerebeloso							
Hemisferio cerebeloso							

Figura 4. Técnicas histológicas realizadas por bloques de tejido en la serie de casos de referencia y en la serie de casos con patología de granos argirófilos.

Figura 5. Tabla de correlación bivariada (Spearman) entre las variables de PGA evaluadas. Nótese el alto número de correlaciones positivas (verde), en las que están implicadas variables de GA y pONF, y las escasas correlaciones negativas (rojo) que afectan en todos los casos a ONF, en niveles anteriores.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

Rábano A, Cuadros C, Calero M, Hernández F, Avila J. Specific profile of tau isoforms in argyrophilic grain disease. *J Exp Neurosci*. 2013; 7: 51-59.

Merino-Serrais P, Benavides-Piccione R, Blazquez-Llorca L, Kastanauskaite A, Rábano A, Avila J, DeFelipe J. The influence of phospho-tau on dendritic spines of cortical pyramidal neurons in patients with Alzheimer's disease. *Brain*. 2013; 136: 1913-1928.

Santa-Maria I, Avila J, Rábano A. Differential expression of human entorhinal cortex support a possible role of some extracellular matrix proteins in the onset of Alzheimer's disease. *Neurosc Lett*. 2010; 468: 225-228.

Rábano A, Cuadros R, Merino-Serrais P, Rodal I, Benavides-Piccione R, Gomez E, Medina M, DeFelipe J, Avila J. The development of tau pathology in Alzheimer's samples. *Methods in Molecular Biology Series*, Humana, Springer. In press.

Rábano A, Rodal I, Cuadros R, Calero M, Hernández F, Avila J. Argyrophilic grain pathology as a natural model of tau propagation. *J Alzheimer Dis*. Submitted.

